

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Variantes genéticas da N-acetiltransferase 2, CYP2E1 e
Glutathione S-transferase: relação com a segurança terapêutica
em pacientes com tuberculose**

Francisco Jose Forestiero

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
**Profa. Assoc. Rosario Dominguez
Crespo Hirata**

São Paulo
2009

Francisco Jose Forestiero

**Variantes genéticas da N-acetiltransferase 2, CYP2E1 e
Glutathiona S-transferase: relação com a segurança terapêutica
em pacientes com tuberculose**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata
Orientador / Presidente

Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso
1o. examinador

Dr. Fernando Augusto Fiúza de Melo
2o. examinador

Profa. Dra. Eliane Ribeiro
3o. examinador

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
4o. examinador

São Paulo, 30 de Abril de 2009.

*No meio do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
tinha uma pedra
no meio do caminho tinha uma pedra.*

*Nunca me esquecerei desse acontecimento
na vida de minhas retinas tão fatigadas.*

*Nunca me esquecerei que no meio do caminho
tinha uma pedra*

*Tinha uma pedra no meio do caminho
no meio do caminho tinha uma pedra.*

Carlos Drummond de Andrade

Dedico esse trabalho,

A minha querida Lê, que com paixão, sempre me confortou com um carinho intenso e verdadeiro em todos os momentos desde o nosso primeiro encontro. Sem você eu nunca teria conseguido. Te amo!

Aos meus destemidos Pais, que de amor incondicional e vontade insuperável, driblaram e contornaram todos os percalços da vida para me proporcionar as melhores oportunidades.

As minhas irmãs Daniela e Isabela, que sempre mantiveram a estrutura familiar e apoio fundamental.

Aos meus avôs, Francesco e Impéria que sempre mostraram um carinho verdadeiro ao longo de toda a minha vida. Que Deus continue a brilhar o novo caminho de vocês.

A minha querida avó Juca, que nunca deixa se abater pelos detalhes da vida.

Aos pequeninos, Pedro Arthur, Guilherme e Bruna, que ainda não fazem idéia do bem estar que fazem na minha vida.

Aos meus Tios, Primos e familiares que ao longo desses anos sempre entenderam as minhas ausências e que mesmo assim continuaram a torcer por mim.

Aos meus amigos, que sempre mostram o quanto é gostoso e essencial um simples minuto de uma conversa, discussão ou festa.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Assoc. Rosario D. C. Hirata, minha orientadora e amiga, por introduzir-me na vida acadêmica e aconselhar-me em todos os momentos difíceis ao longo da minha carreira. Muito obrigado.

Ao Prof. Tit. Mario H. Hirata, que sempre contribuiu de forma essencial com o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal ao longo dos anos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu Diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Chefe, Prof^a. Tit. Ana Campa.

À Profa. Primavera Borelli, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

Ao Dr. Fernando Fiúza de Melo, do Instituto Clemente Ferreira – SP, que demonstra contínua dedicação à pesquisa e abre novas possibilidades para alunos e pacientes.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP)

Aos pacientes com tuberculose que de forma incomparável e anônima contribuíram para este estudo.

RESUMO

FORESTIERO, F.J. **Variantes genéticas da N-acetiltransferase 2, CYP2E1 e Glutathione S-transferase: relação com a segurança terapêutica em pacientes com tuberculose.** 2009. 155f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

Polimorfismos nos genes da n-acetiltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 e glutathione S-transferase (GST) têm sido associados a diferenças na resposta ao tratamento da tuberculose. O papel de variantes dos genes *NAT2*, *CYP2E1* e *GSTM1/GSTT1*, no perfil de segurança do tratamento da tuberculose, foi avaliado em 99 pacientes com tuberculose, sem co-infecção por HIV ou vírus da hepatite, tratados por 6 meses. Amostras de sangue foram colhidas antes e durante o tratamento para avaliação de marcadores de lesão hepatocelular (ASLT e AST), colestase (ALP, GGT e bilirrubinas) e função renal (creatinina). O DNA genômico foi extraído de sangue colhido em EDTA pelo método precipitação salina. Os polimorfismos *NAT2* foram analisados por PCR-RFLP e seqüenciamento de DNA. Os polimorfismos da região promotora do *CYP2E1* foram detectados por PCR-RFLP e para a análise dos genótipos nulos de *GSTM1* (*GSTM1*0*) e *GSTT1* (*GSTT1*0*) foi utilizada a PCR *multiplex*. Durante o tratamento, 59,6% dos pacientes apresentaram reações adversas aos medicamentos (RAM) e alterações nos marcadores de lesão hepatocelular e colestase, com aumento de 1 a 4 vezes o limite superior de referência. Foi observada forte relação entre RAM e alterações nos marcadores séricos ($p < 0,05$) e também com o uso de medicação concomitante ($p < 0,001$). As frequências dos alelos *NAT2*4* e *NAT2*6* foram maiores e menores, respectivamente, quando comparadas com outros estudos na população brasileira. O perfil de acetilador lento (alelos *NAT2*5*, *NAT2*6* e *NAT2*7*) foi associado com manifestação de RAM e hepatotoxicidade. Os portadores dos genótipos *NAT2*4/*5* e *NAT2*5/*5* apresentaram, respectivamente, risco 2,4 e 5,0 vezes maior de RAM que os portadores dos demais genótipos *NAT2* ($p < 0,05$). O genótipo funcional *GSTM1*1/GSTT1*1* foi associado com alterações acentuadas de ALT, AST e ALP ($p < 0,05$). Enquanto que as variantes da *CYP2E1* não foram associadas a alterações no perfil bioquímico ou com risco de RAM ou hepatotoxicidade. Em conclusão, o perfil de acetilação lenta de *NAT2* e o genótipo funcional de *GSTM1/GSTT1* aumentam a susceptibilidade de lesão hepatocelular e outras RAM induzidas pelos antimicrobianos utilizados no tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: NAT2. CYP2E1. GST. Reações Adversas A Medicamentos. Hepatotoxicidade.

ABSTRACT

FORESTIERO, F.J. **Genetic variants of N-acetyltransferase 2, CYP2E1 and Glutathione S-transferase: relation with therapeutic safety in patients with tuberculosis.** 2009. 155f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

Polymorphisms in N-acetyltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 and glutathione S-transferase (GST) have been associated with differences in response to antituberculosis drugs. The role of the *NAT2*, *CYP2E1* and *GSTM1/GSTT1* variants on safety profile of the anti-tuberculosis therapy was evaluated in 99 tuberculosis patients, without co-infection by HIV or hepatitis virus, treated during 6 months. Blood samples were collected before and after the therapy to evaluate serum markers for hepatocellular damage (ASLT and AST), cholestasis (ALP, GGT and bilirubin) and kidney function (creatinine). Genomic DNA was extracted from EDTA-blood samples by salting-out method. *NAT2* polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP and DNA sequencing. *CYP2E1* promoter region polymorphisms were detected by PCR-RFLP and for analysis of the null genotypes *GSTM1* (*GSTM1*0*) e *GSTT1* (*GSTT1*0*) PCR *multiplex* technique was used. During the therapy, 59.6% of the patients had adverse drug reactions (ADR) and alterations on hepatocellular damage and cholestasis serum markers, with increase of 1 to 4 times the upper limit reference level. There was a significant relationship between ADR and serum markers alterations ($p < 0,05$), as well as, the concomitant medicine ($p < 0,001$). The frequencies of the *NAT2*4* and *NAT2*6* alleles were higher and lower, respectively, when compared to other studies in the Brazilian population. The slow acetylator profile (*NAT2*5*, *NAT2*6* and *NAT2*7* alleles) was associated with ADR and hepatotoxicity manifestations. The *NAT2*4/*5* and *NAT2*5/*5* genotypes carriers had, respectively, 2.4 and 5.0 times higher risk for ADR than those carrying the other *NAT2* genotypes ($p < 0,05$). The functional genotype *GSTM1*1/GSTT1*1* was associated with enhanced variations on ALT, AST and ALP ($p < 0.05$). No relationship was found between *CYP2E1* variants and variations on biochemical profile or risk for ADR or hepatotoxicity. In conclusion, the *NAT2* slow acetylator profile and the *GSTM1/GSTT1* functional genotype increase the susceptibility to hepatocellular damage and other ADR induced by antibiotics used in tuberculosis therapy.

Keywords: NAT2. CYP2E1. GST. Adverse Drug Reactions. Hepatotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AIDS | Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida |
| ALP | Fosfatase alcalina |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| BAAR | Bacilo álcool ácido resistente |
| BCG | Bacilo Calmette-Guérin |
| BD | Bilirrubina Direta |
| BT | Bilirrubina Total |
| CEGH | Centro de Estudos do Genoma Humano |
| CONEP | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DOTS | Tratamento diretamente observado de curta duração |
| DP | Desvio Padrão |
| E | Etambutol |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| Et | Etionamida |
| GSTs | Glutathione S-Transferases |
| GTT | Gama-glutamil transferase |
| H | Isoniazida |
| HBV | Virus da Hepatite B |
| HIV | Virus da Imuno Deficiência |
| HWE | Equilíbrio de Hardy-Weinberg |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| ICF | Instituto Clemente Ferreira |
| LSR | Limite superior de referência |
| NAT | N-acetiltransferase |
| OFX | Ofloxacina |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAS | Ácido para-aminosalicílico |
| PB | Pares de Bases |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PPD | Derivado Protéico Purificado |
| R | Rifampicina |
| RAM | Reações Adversas a Medicamentos |
| RFLP | Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição |
| S | Estreptomicina |
| SNP | Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo |

| | |
|------|--|
| TB | Tuberculose |
| TBE | Tampão Tris, ácido bórico e EDTA |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| UV | Ultravioleta |
| Z | Pirazinamida |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Esquema terapêutico 1 indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extra-pulmonar | 21 |
| Tabela 2. Esquema terapêutico 2 indicado para a forma meningoencefálica da tuberculose | 21 |
| Tabela 3. Esquema terapêutico 1 Reforçado (1R) indicado para recidiva após cura ou retorno após abandono do Esquema 1 | 22 |
| Tabela 4. Esquema 3 indicado para falência dos esquemas 1 e 1R. | 22 |
| Tabela 5. Reações adversas (eventos maiores) dos fármacos usados no tratamento da tuberculose. | 24 |
| Tabela 6. Reações adversas (eventos menores) dos fármacos usados no tratamento da tuberculose | 25 |
| Tabela 7. Frequência de indivíduos diagnosticados com tuberculose pulmonar e extrapulmonar. | 36 |
| Tabela 8. Dados para detecção dos polimorfismos <i>NAT2</i> por PCR-RFLP | 41 |
| Tabela 9. Perfis de RFLP para detecção dos polimorfismos <i>NAT2</i> | 41 |
| Tabela 10. Dados para detecção dos polimorfismos <i>CYP2E1</i> por PCR-RFLP | 45 |
| Tabela 11. Condições dos ensaios de PCR para amplificação do <i>NAT2</i> . | 49 |
| Tabela 12. Dados biodemográficos, diagnósticos e terapêuticos dos pacientes incluídos no estudo. | 57 |
| Tabela 13. Dados de perfil bioquímico sérico dos pacientes incluídos no estudo que retornaram para as coletas, antes e após o tratamento com antimicobacterianos. | 60 |
| Tabela 14. Reações adversas a medicamentos (RAM) relatadas pelos indivíduos com tuberculose, durante o tratamento. | 61 |
| Tabela 15. Relação entre RAM e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose. | 63 |
| Tabela 16. Dados de perfil bioquímico de indivíduos com tuberculose que apresentaram ou não reações adversas a medicamentos (RAM). | 65 |
| Tabela 17. Matriz de correlação dos parâmetros laboratoriais no segundo mês de tratamento versus todos os meses de tratamento. | 69 |
| Tabela 18. Matriz de correlação dos parâmetros laboratoriais no quarto mês de tratamento versus todos os meses de tratamento. | 70 |
| Tabela 19. Distribuição de genótipos e frequência de alelos das variantes do <i>NAT2</i> . | 72 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 20. Frequências genótípicas e alélicas de variantes <i>NAT2</i> em pacientes com tuberculose com RAM e com hepatotoxicidade. | 74 |
| Tabela 21. Frequências dos genótipos de acetilação da <i>NAT2</i> em pacientes com tuberculose de acordo com a presença de RAM e hepatotoxicidade. | 75 |
| Tabela 22. Dados de perfil bioquímico de indivíduos com tuberculose, antes e após o tratamento farmacológico, agrupados por genótipos de acetilação <i>NAT2</i> . | 77 |
| Tabela 23. Relação entre genótipos de acetilação <i>NAT2</i> e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose. | 80 |
| Tabela 24. Relação das variantes identificadas no <i>NAT2</i> por seqüenciamento de DNA, dos pacientes do grupo de estudo (n=99). | 82 |
| Tabela 25. Distribuição das frequências alélicas dos SNPs <i>NAT2*5D</i> , <i>NAT2*12</i> e <i>NAT2*13</i> em pacientes com tuberculose que relataram ou não reações adversas (RAM) e em pacientes com e sem hepatotoxicidade. | 85 |
| Tabela 26. Distribuição de genótipos e frequência de alelos das variantes <i>CYP2E1</i> . | 86 |
| Tabela 27. Frequências de genótipos de variantes do <i>CYP2E1</i> em pacientes com tuberculose, de acordo com a presença de RAM ou hepatotoxicidade. | 87 |
| Tabela 28. Dados de perfil bioquímico antes e após o tratamento com antimicobacterianos dos indivíduos portadores dos genótipos <i>CYP2E1</i> . | 89 |
| Tabela 29. Relação entre genótipos <i>CYP2E1</i> e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose. | 93 |
| Tabela 30. Frequências de genótipos e alélicas das variantes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> | 94 |
| Tabela 31. Frequências de genótipos de variantes do <i>GST</i> em pacientes que relataram ou não reações adversas a medicamentos (RAM) e em pacientes com e sem hepatotoxicidade. | 95 |
| Tabela 32. Dados de perfil bioquímico de indivíduos com tuberculose, antes e após o tratamento farmacológico, agrupados por genótipos <i>GST</i> . | 97 |
| Tabela 33. Relação entre variantes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose. | 101 |
| Tabela 34. Análise de regressão logística das variantes do <i>NAT2</i> associadas com reações adversas a medicamentos (RAM). | 103 |
| Tabela 35. Análise de regressão logística das variantes <i>CYP2E1</i> e <i>GST</i> e outras variáveis associadas com reações adversas a medicamentos (RAM). | 104 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação da estrutura tridimensional do modelo NAT1 e NAT2 humanas | 29 |
| Figura 2. Metabolismo da isoniazida no fígado. | 29 |
| Figura 3. Esquema representativo das substituições nas sequências de nucleotídeos para os polimorfismos <i>NAT2*5</i> , <i>NAT2*6</i> e <i>NAT2*7</i> . | 40 |
| Figura 4. Perfis de RFLP dos polimorfismos <i>NAT2</i> separados em gel de poliacrilamida 8% (150V, 15mA, 4h) corado com SYBR Gold. | 44 |
| Figura 5. Perfis de RFLP do <i>CYP2E1*1B</i> separados em gel de poliacrilamida 8% (150V, 15mA, 4h) corado com SYBR Gold. | 46 |
| Figura 6. Perfis de RFLP do <i>CYP2E1*5</i> separados em gel de poliacrilamida 8% (150V, 15mA, 4h) corado com SYBR Gold. | 47 |
| Figura 7. Esquema ilustrativo da estratégia de seqüenciamento do <i>NAT2</i> . | 48 |
| Figura 8. Produtos de PCR do <i>NAT2</i> para seqüenciamento de DNA. | 49 |
| Figura 9. Eletroferograma representativo da análise de seqüência do alelo <i>NAT2*5</i> . | 51 |
| Figura 10. Eletroferograma representativo da análise de seqüência do alelo <i>NAT2*6</i> . | 52 |
| Figura 11. Eletroferograma representativo da análise de seqüência do alelo <i>NAT2*7</i> . | 52 |
| Figura 12. Produtos de PCR <i>multiplex</i> para análise dos genótipos <i>GSTM1*1</i> e <i>GSTT1*1</i> . | 54 |
| Figura 13. Freqüências de reações adversas a medicamentos (RAMs) encontradas nos indivíduos com tuberculose. | 62 |
| Figura 14. Valores de transaminases séricas de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. | 66 |
| Figura 15. Valores de ALP e GGT séricas de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. | 66 |
| Figura 16. Valores de bilirrubina direta e total séricas de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. | 67 |
| Figura 17. Valores de creatinina de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. | 67 |
| Figura 18. Valores ALT e AST durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação <i>NAT2</i> . | 78 |
| Figura 19. Valores ALP e GGT durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação <i>NAT2</i> . | 79 |

| | |
|--|-----|
| Figura 20. Valores de Bilirrubina direta e total durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação <i>NAT2</i> . | 79 |
| Figura 21. Valores creatinina durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação <i>NAT2</i> . | 79 |
| Figura 22. Eletroferograma representativo do seqüenciamento de DNA das variantes <i>NAT2*5D</i> (fita reversa, 341T>C) (A) ; <i>NAT2*12</i> (fita reversa, 803A>G) (B) ; e <i>NAT2*13</i> (fita reversa, 282C>T) (C) . | 83 |
| Figura 23. Eletroferograma representativo do seqüenciamento de DNA. A: Inclusão de “C” na posição 750pb. B: Ilustra a troca de G por C na posição 548pb. C: Ilustra a troca de G por T na posição 724pb. | 84 |
| Figura 24. Comparação dos valores de ALT e AST durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>CYP2E1</i> . | 90 |
| Figura 25. Comparação dos valores de ALP e GGT durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>CYP2E1</i> . | 91 |
| Figura 26. Comparação dos valores de Bilirrubinas (direta e total) durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>CYP2E1</i> . | 91 |
| Figura 27. Comparação dos valores de creatinina durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>CYP2E1</i> . | 92 |
| Figura 28. Comparação dos valores de ALT e AST durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>GST</i> . | 98 |
| Figura 29. Comparação dos valores de ALP e GGT durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>GST</i> . | 99 |
| Figura 30. Comparação dos valores de bilirrubinas (direta e total) durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>GST</i> . | 99 |
| Figura 31. Comparação dos valores de creatinina durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes <i>GST</i> . | 100 |

INDICE

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Epidemiologia e tratamento da tuberculose..... | 16 |
| 1.2 Fatores genéticos associados com a resposta a isoniazida | 28 |
| 2. OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 34 |
| 2.2 Objetivos específicos | 34 |
| 3. CASUISTICA E MÉTODOS | 35 |
| 3.1. Casuística..... | 35 |
| 3.2. Protocolo de tratamento..... | 37 |
| 3.3. Amostras biológicas..... | 38 |
| 3.4. Testes bioquímicos..... | 38 |
| 3.5. Extração de DNA genômico humano..... | 39 |
| 3.6. Pesquisa de polimorfismos do <i>NAT2</i> por PCR-RFLP | 39 |
| 3.7. Pesquisa de variantes do <i>CYP2E1</i> por PCR-RFLP | 44 |
| 3.8. Pesquisa de polimorfismos <i>NAT2</i> por seqüenciamento de DNA | 47 |
| 3.9. Pesquisa de polimorfismos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> por PCR <i>multiplex</i> | 53 |
| 3.10. Análise estatística dos resultados..... | 54 |
| 4. RESULTADOS | 56 |
| 4.1. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes..... | 56 |
| 4.2. Resultados dos polimorfismos <i>NAT2</i> | 71 |
| 4.3. Resultados do seqüenciamento de DNA | 81 |
| 4.4. Resultados dos polimorfismos <i>CYP2E1</i> | 85 |
| 4.5. Análise dos polimorfismos <i>GST</i> | 94 |
| 4.6 Resultados da Análise de Regressão Logística..... | 101 |
| 5. DISCUSSÃO | 105 |
| 6. CONCLUSÕES | 114 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 115 |
| APÊNDICES..... | 125 |
| ANEXOS | 130 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e tratamento da tuberculose

Apesar de ser uma doença passível de prevenção e curável, a tuberculose permanece como a principal causa de morte em adultos decorrente de um único agente infeccioso, apesar de se conhecer seu agente etiológico, suas formas de transmissão e de se dispor de medicamentos eficazes para o tratamento da doença (MAZARS *et al.*, 2001). Atualmente, cerca de um terço da população mundial (aproximadamente 2 bilhões de pessoas) está infectada pelo bacilo da tuberculose tendo sido estimada, somente no ano de 2007, a ocorrência de 9,27 milhões de novos casos e 1,32 milhões de óbitos no mundo (TEIXEIRA *et al.*, 2007; WHO, 2009).

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou a tuberculose como uma situação de emergência global, no âmbito da saúde. Várias iniciativas foram criadas desde então para o controle da doença (WHO, 2006). A iniciativa “Stop TB” estabeleceu na Assembléia Mundial da Saúde em 2000 alguns objetivos como a detecção de 70% dos casos de tuberculose e 85% de sucesso no tratamento (cura) até 2005, que em 2015 a incidência global da doença (óbitos e prevalência) deve estar reduzida em 50% quando comparada aos índices de 1990 e por último que a incidência global da doença será de menos de 1 por 1 milhão na população até 2050, ou seja, eliminação da tuberculose como um problema global de saúde pública.

A taxa de detecção é calculada como o número de casos notificados divididos pelo número de casos esperados no ano, expresso em porcentagem.

Segundo as estimativas atuais da OMS, a incidência de tuberculose no Brasil é de 60 casos por 100 mil habitantes, situando o país na 14^a posição entre os 22 países mais afetados pela doença (WHO, 2009).

Desde 1999 o Ministério da Saúde definiu a tuberculose como prioridade entre as políticas governamentais de saúde. As ações para o controle da tuberculose no Brasil têm como meta diagnosticar pelo menos 90% dos casos esperados e curar pelo menos 85% dos casos diagnosticados (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Globalmente, observou-se sucesso no controle da tuberculose resultado do aumento de 28% em 2000 para 60% em 2005 nas taxas de detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e de sucesso do tratamento de 82% em 2000 para 84% em 2005. Entretanto, a cada ano pelo menos 1,7 milhões de pessoas morrem por tuberculose no mundo, sendo 12% deles associados à epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (WHO, 2007).

Apesar dos progressos, os desafios para o controle da doença ainda permanecem devido à baixa sensibilidade da baciloscopia, particularmente na presença de co-infecção pelo vírus HIV. Como a infecção pelo HIV tem efeito imunossupressor e predispõe o indivíduo infectado a desenvolver a doença, a epidemia de AIDS veio contribuir, a partir de 1981, para o aumento do número de casos notificados de tuberculose, entre eles os casos extrapulmonares, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (ESPINAL *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2007). Enquanto uma em cada dez pessoas imunocompetentes infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* acaba adoecendo

em algum momento de sua vida, entre as pessoas com HIV, uma em cada dez desenvolve a doença por ano (PALOMINO, LEÃO & RITACCO, 2007).

A associação AIDS e tuberculose constitui um sério problema de saúde pública levando ao aumento da morbidade, principalmente dos casos resistentes ao tratamento, e também da mortalidade (HIJJAR *et al.*, 2001; ESPINAL *et al.*, 2001). Em 2003, no Brasil, foi estimada uma prevalência de 0,65% de soropositividade ao vírus HIV na população. Entretanto, entre os pacientes com tuberculose, a prevalência foi de 8%, muito acima do estimado pela OMS de 3,8% (WHO, 2005).

A BCG, vacina produzida com o bacilo Calmette-Guérin (BCG), é a única vacina disponível para a prevenção da tuberculose em humanos. Ela é produzida a partir de uma cepa atenuada, e já foi dada a mais de 2,5 bilhões de pessoas desde 1948, promovendo tanto uma resposta imune humoral como mediada por células. Embora a BCG forneça proteção clara em crianças quando administrada no período neonatal, em adultos, devido a razões ainda pouco esclarecidas, ela varia muito. O nível de proteção difere de acordo com a forma da tuberculose pulmonar; pela co-infecção com o HIV e entre diferentes populações, não apresentando nenhuma proteção na Índia e de 50-80% de proteção no Reino Unido (PALOMINO, LEÃO & RITACCO, 2007).

Na falta de uma vacina homoganeamente eficaz e tendo em vista que a maior fonte de infecção são os indivíduos doentes, o melhor recurso de prevenção disponível no sistema de saúde continua sendo a detecção precoce e o tratamento dos casos (RODRIGUES *et al.*, 2007).

O tratamento da tuberculose teve seu início em 1944 quando a estreptomicina (S) e o ácido para-aminosalicílico (PAS) foram descobertos e passaram a ser usados em terapia combinada. Em 1952, um terceiro medicamento, a isoniazida (H), foi adicionada à combinação prévia melhorando significativamente a eficácia do tratamento, porém a sua duração ainda era longa, de 18 a 24 meses. Em 1960, o etambutol (E) substituiu o PAS e o tempo de tratamento foi reduzido para 18 meses. Nos anos 70, com a introdução da rifampicina (R) na combinação, o tratamento pode então ser encurtado para 9 meses e, finalmente em 1980, a pirazinamida (Z) foi introduzida permitindo a redução do tempo de tratamento para apenas 6 meses (PALOMINO, LEÃO & RITACCO, 2007).

Atualmente, o tratamento permanece complexo e demorado, compreendendo a associação de vários medicamentos, inclusive durante a fase de recuperação clínica do paciente. Em decorrência disso, a taxa de abandono do tratamento é alta e pode resultar no surgimento de formas resistentes do *M. tuberculosis* (RODRIGUES *et al.*, 2007). A resistência a pelo menos INH e RMP é denominada de tuberculose multidrogarresistente (MDR-TB) e o seu tratamento é mais longo e com uso de medicamentos de segunda linha que apresentam maior toxicidade e maior custo quando comparados com os disponíveis para os doentes sensíveis (DYE *et al.*, 2002; MITCHISON, 1998). No Brasil, para fins de notificação e tratamento, considera-se multirresistente aquele caso que apresente resistência *in vitro* à RMP e à INH e a mais um terceiro fármaco dos esquemas padronizados (DALCOLMO *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde recomenda a implantação do tratamento diretamente observado de curta duração (em inglês, *Directly Observed Short Course Treatment* – DOTS), como estratégia para que os pacientes tenham tratamento correto e completo. Essa estratégia tem como principal sustentáculo a observação direta da tomada de medicamento para tuberculose em pelo menos três observações semanais, nos primeiros dois meses, e uma observação por semana, até o seu final. Além disso, o DOTS visa ao aumento da adesão dos pacientes, a maior descoberta das fontes de infecção (pacientes pulmonares bacilíferos) e ao aumento da cura, reduzindo-se o risco de transmissão da doença na comunidade (BRASIL, 2005).

No Brasil, os esquemas terapêuticos são padronizados e as recomendações variam de acordo com a forma clínica da doença, idade do paciente, história de tratamento anterior e resultado do tratamento (cura ou falha), co-infecção pelo HIV, perfil de resistência e disponibilidade de antimicobacterianos, entre outros fatores. Todos os esquemas são constituídos de duas fases: (1) fase de ataque, na qual se utiliza a associação de medicamentos com alto poder bactericida, com o intuito de se reduzir rápida e drasticamente a população bacilar e a proporção de mutantes resistentes; e (2) fase de manutenção que tem como objetivo a eliminação dos bacilos persistentes e a prevenção de recaídas e recidivas (BRASIL, 2002).

O Esquema 1 está indicado para pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar, sem história de tratamento anterior, exceto os portadores da forma meningoencefálica (Tabela 1). Para os casos de tuberculose meningoencefálica concomitantes com outras formas de tuberculose, recomenda-se o Esquema 2 (Tabela 2). Os pacientes com necessidade de novo tratamento por recidiva após

cura ou retorno após abandono, independentemente do tempo decorrido, recomenda-se o Esquema 1 reforçado (1R) (Tabela 3). Para o tratamento após falência dos esquemas terapêuticos básicos (1 e 2) ou reforçado, ou seja, na persistência de positividade na baciloscopia ao final do tratamento, é preconizado o Esquema 3 (Tabela 4) (BRASIL, 2002).

Tabela 1. Esquema terapêutico 1 indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extra-pulmonar.

| Fase do tratamento | Fármaco | Dose com base no peso paciente | | | |
|----------------------|---------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | Até 20 Kg (mg/Kg/dia) | 20 a 35 Kg (mg/Kg/dia) | 35 a 45 Kg (mg/Kg/dia) | Mais 45 Kg (mg/Kg/dia) |
| 1ª fase (2 meses) | R | 10 | 300 | 450 | 600 |
| | H | 10 | 200 | 300 | 400 |
| | Z | 35 | 1000 | 1500 | 2000 |
| 2ª fase (4 meses) | R | 10 | 300 | 450 | 600 |
| | H | 10 | 200 | 300 | 400 |

Nota: R: rifampicina; H: isoniazida; Z: pirazinamida. Fonte – BRASIL, 2002.

Tabela 2. Esquema terapêutico 2 indicado para a forma meningoencefálica da tuberculose.

| Fase do tratamento | Fármaco | Dose com base no peso paciente | | | |
|----------------------|---------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | Até 20 Kg (mg/Kg/dia) | 20 a 35 Kg (mg/Kg/dia) | 35 a 45 Kg (mg/Kg/dia) | Mais 45 Kg (mg/Kg/dia) |
| 1ª fase (2 meses) | R | 10 a 20 | 300 | 450 | 600 |
| | H | 10 a 20 | 200 | 300 | 400 |
| | Z | 35 | 1000 | 1500 | 2000 |
| 2ª fase (7 meses) | R | 10 a 20 | 300 | 450 | 600 |
| | H | 10 a 20 | 200 | 300 | 400 |

Nota: R: rifampicina; H: isoniazida; Z: pirazinamida. Fonte – BRASIL, 2002.

Tabela 3. Esquema terapêutico 1 Reforçado (1R) indicado para recidiva após cura ou retorno após abandono do Esquema 1.

| Fase do tratamento | Fármaco | Dose com base no peso paciente | | | |
|--------------------|---------|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Até 20 Kg (mg/Kg/dia) | 20 a 35 Kg (mg/Kg/dia) | 35 a 45 Kg (mg/Kg/dia) | Mais 45 Kg (mg/Kg/dia) |
| 1ª fase | R | 10 | 300 | 450 | 600 |
| (2 meses) | H | 10 | 200 | 300 | 400 |
| | Z | 35 | 1000 | 1500 | 2000 |
| | E | 25 | 600 | 8100 | 1200 |
| 2ª fase | R | 10 | 300 | 450 | 600 |
| (4 meses) | H | 10 | 200 | 300 | 400 |
| | E | 25 | 600 | 800 | 1200 |

Nota: R: rifampicina; H: isoniazida; Z: pirazinamida; E: etambutol. Fonte: BRASIL, 2002.

Tabela 4. Esquema 3 indicado para falência dos esquemas 1 e 1R.

| Fase do tratamento | Fármaco | Dose com base no peso paciente | | | |
|--------------------|---------|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Até 20 Kg (mg/Kg/dia) | 20 a 35 Kg (mg/Kg/dia) | 35 a 45 Kg (mg/Kg/dia) | Mais 45 Kg (mg/Kg/dia) |
| 1ª fase | S | 20 | 500 | 1000 | 1000 |
| (3 meses) | Z | 35 | 1000 | 1500 | 2000 |
| | E | 25 | 600 | 800 | 1200 |
| | Et | 12 | 250 | 500 | 750 |
| 2ª fase | E | 25 | 600 | 800 | 1200 |
| (9 meses) | Et | 12 | 250 | 250 | 750 |

Nota: S: estreptomicina; Z: pirazinamida; E: etambutol; Et: etionamida. Fonte: BRASIL, 2002.

A eficácia no Brasil do principal esquema de tratamento (esquema 1) é elevada, em torno de 98%. Mesmo considerando-se a ocorrência de óbitos de 7% e a taxa de abandono de 12%, a efetividade do esquema 1 cai para 83%, mas continua adequada. Entretanto, o abandono do tratamento permanece como o principal problema para melhor efetividade do tratamento (BRASIL, 2005).

A quimioprofilaxia da tuberculose é indicada em pacientes com PPD positivo, porém sem sinais clínicos da doença ativa (infecção latente) especialmente quando há risco de desenvolvimento da tuberculose, como por exemplo, pacientes HIV positivos (BALCELLS *et al.*, 2006; CDC, 2003). Geralmente apenas a isoniazida é administrada, na dose de 300mg por dia por 6 a 9 meses (embora haja o risco de desenvolvimento de resistência).

Os pacientes que não se curam após tratamento com os esquemas padronizados pelo Ministério da Saúde, portadores de bacilos resistentes a mais de dois fármacos, dentre os quais a R e a H, constituem um grupo de pacientes classificados como portadores de tuberculose multirresistente. A este grupo, são agregados os pacientes que apresentam resistência primária à R, H e a outros fármacos utilizados, geralmente a S e/ou E.

A maioria dos pacientes submetidos ao tratamento da tuberculose consegue completar o tempo recomendado sem sentir qualquer efeito colateral relevante. Entretanto, de 5 a 20% dos pacientes submetidos ao tratamento da tuberculose apresentam alguma reação adversa a medicamentos (RAM), que é definida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como “qualquer resposta a um medicamento que seja prejudicial, não intencional, e que ocorra nas doses normalmente utilizadas em seres humanos para profilaxia, diagnóstico

e tratamento de doenças, ou para a modificação de uma função fisiológica" (BRASIL, 2002).

Os determinantes das reações adversas são multifatoriais e se referem principalmente à dose, aos horários de administração da medicação, à idade, ao estado nutricional, ao etilismo, às condições da função hepática e renal e à co-infecção pelo HIV (HUANG *et al.*, 2002; PALOMINO, LEÃO & RITACCO, 2007).

Nas tabelas 5 e 6, são apresentadas as principais reações adversas relacionadas aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. As reações adversas a medicamentos são classificadas em efeitos maiores e menores. Os efeitos maiores são aqueles que implicam interrupção ou alteração do tratamento e são menos freqüentes, ocorrendo em torno de 2% dos casos, podendo chegar a 8% em serviços especializados; os efeitos menores ocorrem entre 5% a 20% dos casos e são assim classificados porque não implicam em modificação imediata do esquema padronizado (VUILLEUMIER *et al.*, 2006; BRASIL, 2005).

Tabela 5. Reações adversas (eventos maiores) dos fármacos usados no tratamento da tuberculose.

| Eventos Maiores | Fármacos |
|---|-------------------------------|
| Exantemas (erupção de pele) | Rifampicina Estreptomicina |
| Hipoacusia (perda de audição) | Estreptomicina |
| Vertigem e nistagmo (oscilações repetidas e involuntárias rítmicas de um ou ambos os olhos) | Estreptomicina |
| Psicose, crise convulsiva, encefalopatia tóxica e coma | Isoniazida |
| Neurite óptica | Etambutol Isoniazida |

| | |
|--|---------------------------|
| Hepatotoxicidade (alteração das provas de função hepática) | Todos os fármacos |
| Trombocitopenia, leucopenia, eosinofilia, anemia hemolítica, agranulocitose, vasculite | Rifampicina Isoniazida |
| Nefrite Intersticial | Rifampicina |
| Rabdomiólise (síndrome causada por danos na musculatura esquelética) com mioglobinúria e insuficiência renal | Pirazinamida |

Fonte – BRASIL, 2005.

Tabela 6. Reações adversas (eventos menores) dos fármacos usados no tratamento da tuberculose.

| Eventos Menores | Fármaco |
|---|---|
| Irritação gástrica (náusea e vômito), epigastralgia e dor abdominal | Rifampicina Isoniazida Pirazinamida |
| Artralgia ou artrite | Pirazinamida Isoniazida |
| Neuropatia periférica (dormência das extremidades) | Isoniazida Etambutol |
| Cefaléia ou mudança de comportamento (euforia, insônia, ansiedade e sonolência) | Isoniazida |
| Suor e urina alaranjada | Rifampicina |
| Prurido cutâneo | Isoniazida Rifampicina |
| Hiperuricemia | Pirazinamida Etambutol |
| Febre | Rifampicina Isoniazida |

Fonte – BRASIL, 2005.

A hepatotoxicidade é uma das reações adversas mais graves no tratamento da tuberculose e, a maioria dos casos de hepatite induzida por antimicobacterianos têm sido relacionados com a rifampicina, pirazinamida e, especialmente, à isoniazida. Sua incidência varia de 1 a 47% dependendo dos diferentes esquemas terapêuticos usados e também das definições de hepatite usadas nos estudos, que consideram variações de 2 a 5 vezes o limite superior de referência (LSR) nas concentrações séricas das aminotransferases, com ou sem a presença de icterícia concomitante (HUANG, 2007). Além disso, etnia, gênero, idade avançada, baixo peso corpóreo, etilismo, infecção por HIV e hepatite viral B e C também têm sido relatados como fatores de risco para hepatite induzida por antimicobacterianos (GARG & TANDON, 2003; ROY, 2003).

O potencial hepatotóxico da isoniazida e da rifampicina bem como o risco maior de hepatotoxicidade quando essas medicações são usadas concomitantemente já são bem conhecidos. Entretanto, também se observa uma alta prevalência de tuberculose em associação com o vírus da hepatite o que poderia levar a uma atribuição errônea da hepatotoxicidade a esses medicamentos (KUMAR *et al.*, 1991).

Episódios agudos de hepatite são comuns na prática clínica em pacientes portadores do vírus da hepatite B (HBV) durante o tratamento com fármacos antituberculose. WU e colaboradores (1990) determinaram que os portadores do HBV embora apresentassem os sintomas da hepatite induzida por isoniazida e rifampicina mais tardiamente, geralmente apresentavam níveis elevados de ALT e bilirubina, icterícia grave e maior fatalidade que indivíduos não portadores.

É possível que a isoniazida e a rifampicina agravem os quadros de hepatite viral leve ou sub-clínica, mas por outro lado, também é possível que a hepatite viral aumente a toxicidade da isoniazida e rifampicina (KUMAR *et al.*, 1991). Como o período de latência da hepatotoxicidade pode variar de uma semana a mais de 6 meses, tendo como média 8 semanas, o monitoramento dos pacientes em uso de isoniazida é um fator importante na prevenção de hepatotoxicidade (ACHARYA *et al.*, 1996). Se a isoniazida for descontinuada antes da ocorrência de um dano hepático mais grave, a recuperação é mais rápida, o que também reduz a taxa de abandono do tratamento pelo paciente (GARG & TANDON, 2003; HUANG *et al.*, 2002).

A gravidade da lesão hepática induzida por antimicobacterianos pode variar de pequenas alterações não-específicas na estrutura anatomo-funcional ao desenvolvimento de cirrose, insuficiência e câncer hepático (HUANG *et al.*, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2003).

Histórico de etilismo geralmente é uma contra-indicação ao uso de isoniazida e rifampicina, uma vez que o etilismo predispõe o paciente à hepatotoxicidade. Entretanto, como o etilismo é uma condição multifacetada apresentando aspectos sociais, comportamentais, psicológicos e físicos, a declaração pelo próprio paciente tem sido o principal meio de avaliação, baseado na quantidade de álcool consumido relatado pelo paciente, o que limita o seu diagnóstico (CROSS *et al.*, 1980). Esse mesmo estudo indicou que pacientes etílicos apresentam elevações anormais de aspartato aminotransferase (AST) mais freqüentes durante a terapia antituberculose quando comparados a pacientes não etílicos. Entretanto, esses pacientes não apresentam uma propensão maior a reações hepáticas induzidas pela rifampicina e isoniazida que

sejam severas o suficiente a ponto de interromper o tratamento por mais que 14 dias.

1.2 Fatores genéticos associados com a resposta a isoniazida

A isoniazida é rapidamente absorvida quando administrada por via oral e parenteral, e a sua concentração plasmática é de 3 a 5 $\mu\text{g/mL}$ após uma a duas horas da ingestão, distribuindo-se por todos os fluídos e células. A excreção da isoniazida é preferencialmente pela via urinária, com 75-95% da dose inicial excretada em 24 horas (NIEMI *et al.*, 2003).

O processo de metabolização inicia-se no fígado, onde a isoniazida é acetilada pela N-acetiltransferase (NAT) (Figura 1) para acetilisoniazida, seguida de hidrólise para acetilhidrazina que é então oxidada a compostos intermediários hepatotóxicos pela isoenzima do citocromo P450 2E1 (CYP2E1) (YUE *et al.*, 2009) (Figura 2). Outra via importante na formação de intermediários tóxicos é a hidrólise direta da isoniazida pela amidohidrolase, sem a prévia acetilação, produzindo a hidrazina que também pode induzir dano hepático (HUANG *et al.*, 2002). O tempo necessário para que os metabólitos atinjam concentrações hepatotóxicas é menor quando se utiliza a isoniazida associada à rifampicina quando comparada com a isoniazida isolada e o efeito é predominantemente sinérgico (HUSSAIN *et al.*, 2003).

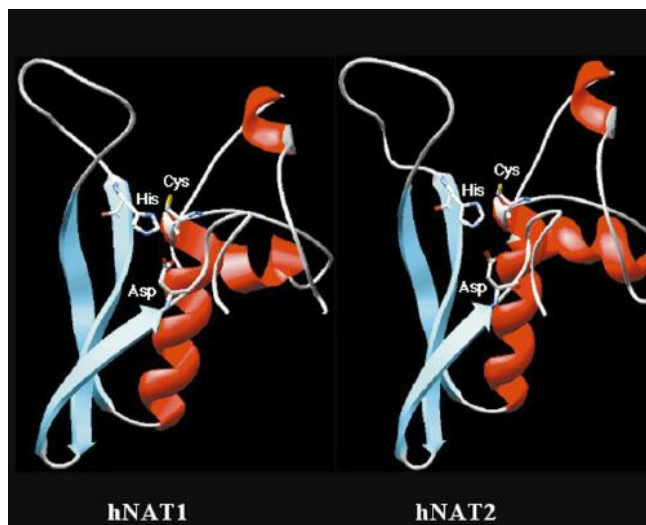


Figura 1. Representação da estrutura tridimensional do modelo NAT1 e NAT2 humanas (RODRIGUES-LIMA *et al.*, 2002).

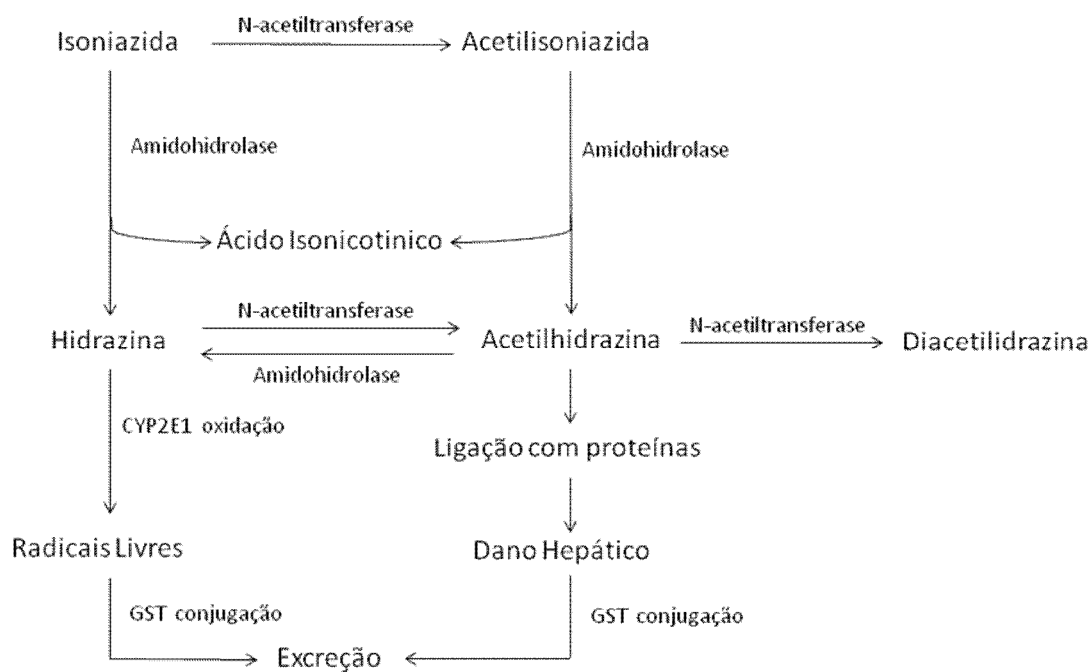


Figura 2. Metabolismo da isoniazida no fígado (YUE *et al.*, 2009).

A reação de acetilação, envolvida no processo de metabolização da isoniazida, ocorre pela transferência de um grupo acetil provindo da acetilcoenzima A (acetil-CoA), para um grupo amino livre formando uma acetilamida. Em humanos, as reações de acetilação são catalisadas pela N-acetiltransferase presente no citosol, que apresenta duas isoformas, a N-acetiltransferase-1 (NAT1) e a N-acetiltransferase-2 (NAT2) (BROOKE, *et al.*, 2003).

Para o gene da N-acetiltransferase-2 (NAT2), alguns polimorfismos foram identificados e descritos classificando o perfil de acetilação dos indivíduos em acetiladores rápido, intermediário ou lento (SMITH *et al.*, 1997). O NAT2*4 é definido como o alelo de referência para o NAT2 humano, pois está associado com elevada atividade da enzima e é o alelo mais freqüente (68%) na população originalmente estudada, os japoneses (HEIN, 2002; UPTON *et al.*, 2001). Três principais alelos, denominados NAT2*5 (*rs1799929*), NAT2*6 (*rs1799930*) e NAT2*7 (*rs1799931*), estão relacionados com o perfil de acetilador lento, resultando em diminuição da atividade da isoenzima NAT2 (SMITH *et al.*, 1997). A freqüência desses alelos em caucasianos americanos é 42-45%, 28-31% e 2%, respectivamente (HEIN, 2002).

O perfil de acetilação e sua relação com o risco de dano hepático induzido por fármacos antituberculose têm sido discutido por mais de 3 décadas e é notável em quase todos os estudos que o fenótipo pode ser influenciado por vários fatores tais como idade, sexo, dieta, consumo de álcool, abuso de drogas, desordens hepáticas entre outros (MITCHELL *et al.*, 1975; YAMATOTO *et al.*, 1986; PANDE *et al.*, 1996).

A NAT2 também é responsável pela acetilação da monoacetil-hidrazina (metabólito tóxico da isoniazida) em diacetil-hidrazina (metabólito não tóxico). Os acetiladores rápidos produzem mais monoacetil-hidrazina que os lentos, mas por outro lado também a transforma em diacetil-hidrazina mais rapidamente o que leva alguns autores a aceitar que a hidrazina, resultado do metabolismo direto da isoniazida estimulado pela indução microssomial da rifampicina, seja o principal responsável pelo desenvolvimento de hepatite no uso dessa associação (MORRONE *et al.*, 1993; FIUZA DE MELO *et al.*, 1996; CYNAMON *et al.*, 1994).

MITCHELL e colaboradores (1975) primeiramente afirmaram que acetiladores rápidos seriam mais vulneráveis aos danos hepáticos induzidos por medicamentos antituberculose uma vez que eles produziram hepatotoxinas mais rapidamente através da rápida atividade da NAT. Entretanto, resultados diferentes foram encontrados por GURUMURTHY e colaboradores (1983).

Os resultados deste estudo mostraram conclusivamente que os acetiladores rápidos não apresentam um risco maior de dano hepático comparados aos lentos acetiladores durante o tratamento com regimes contendo isoniazida, sendo a incidência entre os dois fenótipos de 1,2% e 1,9%, respectivamente (GURUMURTHY *et al.*, 1983). Estudos farmacológicos sugerem que a exposição à monoacetilhidrazina é similar nos dois fenótipos, sendo a formação mais rápida nos acetiladores rápidos contrabalanceada pela rápida eliminação via diacetilhidrazina (ELLARD, 1976).

Já HUANG e colaboradores (2002) concluíram que acetiladores NAT2 lentos apresentam maior probabilidade em desenvolver dano hepático que os acetiladores rápidos enfatizando, portanto, a hipótese de que a acetilação

apresenta um importante papel na patogênese da hepatite induzida por fármacos (HUANG, 2007).

Vários polimorfismos, incluindo os de nucleotídeo único (SNPs), foram descritos para o gene da CYP2E1 incluindo dois na região promotora, -1053C>T e -1293G>C que caracterizam o alelo *CYP2E1*5B* (WATANABE *et al.*, 1994; HAYASHI *et al.*, 1991; DALY *et al.*, 1998). Esses SNPs foram associados com diminuição na taxa de transcrição gênica e na atividade enzimática sobre vários compostos químicos e estão relacionados com a susceptibilidade à hepatite induzida por fármacos incluindo as utilizadas no tratamento da tuberculose (HUSSAIN *et al.*, 2003; SEGADO *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005). Na população brasileira, a frequência desses SNPs é de 5% (ROSSINI *et al.*, 2006).

Outra classe de enzimas importantes que participam no processo de biotransformação de fármacos é a das Glutathione S-transferases (GSTs). As enzimas GST- μ e GST- θ apresentam papel crítico na proteção celular contra o estresse oxidativo e compostos tóxicos exógenos e são codificadas pelos genes *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente (HAYES & STRANGE, 2000)

Para *GSTM1* foram descritos quatro alelos *GSTM1*A*, *GSTM1*B*, *GSTM1*0*, e *GSTM1*1x2* (HAYES & STANGE, 2000). Os alelos *GSTM1*A* e *GSTM1*B* parecem ser funcionalmente semelhantes entre si, enquanto que nos portadores do alelo *GSTM1*0* a atividade enzimática está reduzida ou ausente. Coletivamente, os genótipos *GSTM1*1* podem ser categorizados em duas classes: os genótipos homocigotos para a deleção do gene (*GSTM1*0/GSTM1*0*), denominado *GSTM1* nulo, e os genótipos com um ou dois alelos não deletados, denominados *GSTM1* não-nulos. De forma semelhante, dois genótipos *GSTT1*

funcionalmente diferentes foram identificados, os genótipos homozigotos para a deleção do gene (*GSTT1*0/GSTT1*0*), denominado *GSTT1* nulo, e os genótipos com um ou dois alelos não deletados (*GSTT1* não-nulos) (PEMBLE *et al.*, 1994). As variantes nulas estão associadas com dificuldade de detoxificar potenciais substâncias carcinogênicas e têm sido relacionadas com várias formas de dano hepático, incluindo o carcinoma hepatocelular (EATON, 2000; ROY *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2005). Segundo o trabalho de Rossini (ROSSINI *et al.*, 2002) a população brasileira apresenta 42,1% e 25,4% de frequência do genótipo nulo para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente. Dessa forma, os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* podem modular a suscetibilidade a hepatotoxicidade induzida por fármacos.

Polimorfismos genéticos podem modificar a atividade metabólica de enzimas envolvidas nas vias de biotransformação de xenobióticos. Essas modificações afetam a eficiência terapêutica e podem predispor os indivíduos a reações adversas, principalmente a hepatotoxicidade induzida por fármacos e seus metabólitos. Poucos estudos têm investigado o papel dessas alterações genéticas na eficácia e segurança de medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose, como a isoniazida. E, embora os dados disponíveis ainda sejam limitados e necessitem de confirmação em diferentes populações étnicas, é importante destacar a importância da farmacogenética ou farmacogenômica na prevenção de lesões hepáticas induzidas por antimicobacterianos (HUANG, 2007). Portanto, estudos dessa natureza se fazem necessários para avaliar os determinantes genéticos de resposta terapêutica na tuberculose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a relação entre os polimorfismos do *NAT2*, *CYP2E1* e *GSTM1/GSTT1* e o perfil de resposta a antimicobacterianos em pacientes com tuberculose.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1) Conhecer as frequências alélicas dos polimorfismos do *NAT2*, *CYP2E1* e *GSTM1/GSTT1* na população de estudo;

2.2.2) Avaliar a relação entre os polimorfismos genéticos e a presença ou ausência de reações adversas e hepatotoxicidade durante a terapia da tuberculose;

2.2.3) Avaliar a relação entre os polimorfismos genéticos sobre os marcadores de lesão celular hepática, colestase hepática e de disfunção renal.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

No período de 01 de novembro de 2005 a 20 de Dezembro de 2008, aproximadamente 800 indivíduos adultos (18 a 70 anos de idade), de ambos os sexos, sem vínculo genético, e com suspeita clínica de tuberculose, foram triados no Serviço de Pneumologia do Instituto Clemente Ferreira (IFC), São Paulo-SP e na Universidade Estadual de Maringá-PR, dos quais 153 indivíduos foram selecionados para participar do estudo.

Os indivíduos foram informados do protocolo de estudo que foi previamente aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (ANEXO C) e somente participaram do estudo os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APENDICE). Neste momento foram obtidos os dados de Sexo, Etnia, Idade, Etilismo (consumo diário de cerveja, vinho e doses de bebidas destiladas de >1g/dia) e História Médica. Os dados das medicações concomitantes utilizadas durante o tratamento foram obtidos diretamente dos prontuários médicos.

Dos indivíduos selecionados, 104 apresentaram tuberculose confirmada por diagnóstico clínico e laboratorial. O diagnóstico clínico foi fundamentado na manifestação de febre, emagrecimento, tosse com expectoração por mais de três semanas e história pregressa de tuberculose, em conjunto com exames complementares como radiografia de tórax, tomografia computadorizada e

biópsia. O diagnóstico laboratorial foi confirmado por baciloscopia e cultura de escarro e prova tuberculínica cutânea (teste do PPD) (BRASIL, 2002).

Os demais indivíduos (n= 49) foram excluídos do estudo por não terem tuberculose confirmada por diagnóstico clínico e laboratorial e apresentar suspeita ou co-infecção pelo HIV ou hepatite.

Adicionalmente, 5 indivíduos com tuberculose confirmada, foram excluídos posteriormente do estudo por apresentarem informações incompletas nos prontuários.

Dos indivíduos incluídos neste estudo (n= 99), 82 apresentaram tuberculose pulmonar e 17 apresentaram formas de tuberculose extra-pulmonar, descritas na tabela 7.

Tabela 7. Frequência de indivíduos diagnosticados com tuberculose pulmonar e extrapulmonar.

| Diagnóstico | Frequência (n) | % | % Acumulado |
|--------------------|-----------------------|--------------|--------------------|
| TB pulmonar | 82 | 82,8 | 82,8 |
| TB pleural | 10 | 10,1 | 92,9 |
| TB ganglionar | 3 | 3,0 | 96,0 |
| TB cutânea | 2 | 2,0 | 98,0 |
| TB Oftálmica | 1 | 1,0 | 99,0 |
| TB óssea | 1 | 1,0 | 100,0 |
| Total | 99 | 100,0 | |

3.2. Protocolo de tratamento

Os pacientes sem história pregressa de tuberculose foram tratados com o esquema terapêutico 1 preconizado pelo Ministério da Saúde. No caso de falha na resposta terapêutica ao esquema 1, foi aplicado o esquema 3, também preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002). Ambos os esquemas encontram-se descritos nas tabelas 1 e 4 da introdução.

Os pacientes com história clínica prévia de tuberculose utilizaram os esquemas de tratamento preconizados, incluindo esquemas que utilizam a ofloxacina como um dos fármacos {SEO (3SEOFX / EOFX) ou SHE (3SHE / 9HE) ou SER (2SRE / 4RE)}.

A resposta foi considerada favorável quando, ao final do tratamento, duas ou mais baciloscopias estavam negativas, a expectoração estava ausente e os resultados de exames complementares (radiografia do tórax, tomografia ou outros) eram indicativos de cura clínica (BRASIL, 2002).

A falha na resposta terapêutica foi determinada quando a baciloscopia de escarro se manteve positiva ao final do tratamento, quando a baciloscopia estava fortemente positiva (++ ou +++) no início do tratamento e se manteve positiva até o quarto mês, ou quando se tornou negativa na fase inicial do tratamento e posteriormente se positivou por dois meses consecutivos (BRASIL, 2002).

Durante o tratamento, foram obtidas informações sobre as RAM relatadas pelos pacientes, bem como sinais clínicos indicativos de comprometimento hepático (icterícia) e outros sintomas como vômitos e náuseas. Também foram determinados os marcadores de lesão celular hepática [alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)], colestase hepática [fosfatase alcalina

(ALP); gama-glutamil transferase (GGT); bilirrubina direta e total] e de disfunção renal (creatinina) (BRASIL, 2002).

A presença de hepatotoxicidade foi considerada quando aminotransferases séricas (ALT ou AST) apresentava valores acima de três vezes o LSR, e/ou bilirrubina total acima de 2 mg/dL, de acordo com o Consenso Brasileiro de Tuberculose (FILHO *et al.*, 2004).

3.3. Amostras biológicas

No início do estudo, foram coletadas amostras de sangue (5mL) sem anticoagulante para determinação de parâmetros bioquímicos séricos AST, ALT, ALP, GGT, bilirrubina direta e total e creatinina. Também foi obtida amostra de sangue (4mL) coletada em anticoagulante (EDTA 1mg/mL sangue) para a extração de DNA genômico.

Durante o tratamento, foram obtidas amostras de escarro para avaliação da resposta ao tratamento a cada dois meses. Também foram coletadas amostras de sangue para os testes bioquímicos com a finalidade de detectar disfunção hepática ou renal causadas pelo uso de medicamentos antimicobacterianos.

3.4. Testes bioquímicos

A análise das enzimas AST (WROBLEWSKI & LA DUE, 1956), ALT (KARMEN *et al.*, 1955), ALP (DGKC, 1972) e GGT (SSCC, 1976) foram realizados por métodos cinéticos otimizados no UV. A creatinina foi determinada

por método enzimático-colorimétrico (HORDER *et al.*, 1991) e as bilirrubinas por método colorimétrico (JENDRASSIK & GROF, 1938).

3.5. Extração de DNA genômico humano

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total periférico, colhido com EDTA, pelo método de precipitação salina modificada por SALAZAR e colaboradores (1998), desenvolvido em nosso laboratório. A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética (100 V por 30 min) em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X [Tris-HCL 0,45 mM, ácido bórico 0,45mM e EDTA 2,5 mM (pH 8,0)] corado em solução de brometo de etídeo (300ng/mL).

A quantificação e análise de pureza foram realizadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ® (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA).

3.6. Pesquisa de polimorfismos do *NAT2* por PCR-RFLP

Os polimorfismos *NAT2**5 (rs1799929), *NAT2**6 (rs1799930) e *NAT2**7 (rs1799931) estão localizados respectivamente nas posições +481pb, +590pb e +857pb do *NAT2*. As seqüências dos polimorfismos *NAT2**5, *NAT2**6 e *NAT2**7 são reconhecidas pelas endonucleases *EcoRII*, *TaqI* e *XhoI*, respectivamente, e foram confirmadas com o auxílio do programa Primer Premier versão 5.00 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, EUA).

Na figura 3, é apresentado um esquema ilustrativo das substituições de nucleotídeos para cada polimorfismo e, na tabela 8, encontram-se as seqüências de reconhecimento das enzimas descritas.

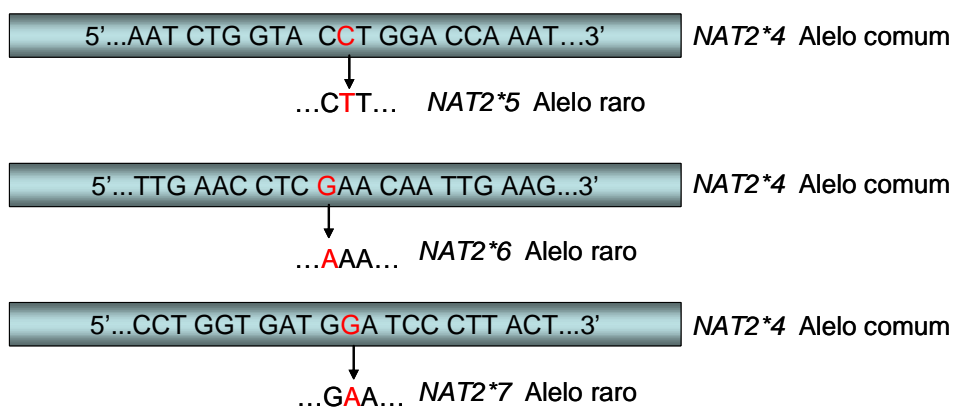


Figura 3. Esquema representativo das substituições nas seqüências de nucleotídeos para os polimorfismos *NAT2*5*, *NAT2*6* e *NAT2*7*.

Para amplificação da região que contém os polimorfismos *NAT2* foram utilizados os iniciadores denominados NAT2F3 e NAT2R4 que permitem gerar um produto de 608 pb. Esse produto contém os sítios polimórficos e constitutivos para as três enzimas (Tabela 8). Essa estratégia é muito conveniente, uma vez que há possibilidade de testar a eficiência e a reprodutibilidade das reações de restrição enzimática através da detecção dos fragmentos gerados pelos sítios constitutivos. Por esta estratégia, os perfis de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP), indicados na tabela 9, são muito consistentes.

Tabela 8. Dados para detecção dos polimorfismos *NAT2* por PCR-RFLP.

| Polimorfismo | Enzima de restrição | Seqüência de reconhecimento | Posição do sítio de reconhecimento (*) | |
|-------------------------|---------------------|---|--|-------------------|
| <i>NAT2</i> *5 C481T | <i>EcoRII</i> | ^CCWGG (W = A ou T) | polimórfico constitutivo | 710 pb 1077 pb |
| <i>NAT2</i> *6 G590A | <i>TaqI</i> | T^CGA | polimórfico constitutivo | 819 pb 989 pb |
| <i>NAT2</i> *7 G857A | <i>XhoI</i> | R^GATCY (R = A ou G) (Y = C ou T) | constitutivo polimórfico | 981 pb 1087 pb |

(*) Código de acesso GI 11321494 (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Tabela 9. Perfis de RFLP para detecção dos polimorfismos *NAT2*.

| | Genótipos | Enzima | Fragmentos de restrição | | | |
|----------------|-----------|---------------|-------------------------|--------|--------|--------|
| <i>NAT2</i> *5 | *4/*4 | <i>EcoRII</i> | 117 pb | 124 bp | 367 bp | |
| | *4/*5 | | 117 pb | 124 bp | 367 bp | 491 bp |
| | *5/*5 | | 117 pb | | | 491 bp |
| <i>NAT2</i> *6 | *4/*4 | <i>TaqI</i> | 170 pb | 205 bp | 233 bp | |
| | *4/*6 | | 170 pb | 205 bp | 233 bp | 403 bp |
| | *6/*6 | | | 205 bp | | 403 bp |
| <i>NAT2</i> *7 | *4/*4 | <i>XhoI</i> | 107 pb | | | 395 bp |
| | *4/*7 | | 107 pb | 213 bp | 395 bp | |
| | *7/*7 | | | 213 bp | 395 bp | |

Os ensaios de PCR foram realizados em tubos de 0,2 mL contendo 50 ng de DNA, iniciadores 160 nM (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA), desoxi-nucleotídeos (dNTP) 200 mM (Pharmacia Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), DNA polimerase 1 U e tampão de PCR [Tris-HCl 75 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM] (Biotools B&M Labs, Madrid, Espanha).

A PCR foi realizada em termociclador PTC-200TM (MJ Research, Inc., Waltham, MA, EUA), programado da seguinte maneira: 94°C por 5 min; 28 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em cuba eletroforética Horizon 58 (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA) realizada a 100 V durante 30 min utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Suécia). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA 100bp (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). O gel foi corado em solução de brometo de etídio 300 ng/mL e as bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV e registradas utilizando-se o sistema Digital com câmera CCD (Multimage Light Cabinet AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

Os ensaios de RFLP foram realizados por incubação dos produtos de PCR com 2 U de cada enzima de restrição por 4 h, nas temperaturas de 60°C para *EcoRII* (Promega – Madison, WI, EUA), 65°C para a *TaqI* (Jena Biosciences GmbH, Jena, Alemanha) e 37°C para a *XhoI* (Fermentas International Inc., Ontário, Canadá).

Os produtos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (19:1 acrilamida/bisacrilamida) em tampão TBE 1X [Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM (pH 8,0)] utilizando-se uma cuba vertical da Gibco BRL (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Como referência foi utilizado marcador de tamanho molecular de DNA 50pb (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A separação eletroforética foi realizada a 150 V, 15 mA por 4h. Os géis foram corados com SYBRGold 100 ng/mL (Invitrogen Detection Technologies, Eugene, OR, EUA) por 20 min. Os produtos de RFLP foram visualizados sob luz UV e registrados como descrito anteriormente.

Na figura 4, são apresentados os perfis de RFLP para os três polimorfismos *NAT2* estudados. Nas posições 3 a 8, observa-se o perfil de RFLP *EcoRII* do *NAT2**5, onde o genótipo *4/4* é observado nas posições 5 a 7 e o *4/5* nas posições 3, 4 e 8; nas posições 9 a 13, o perfil RFLP *TaqI* do *NAT2**6, onde o genótipo *4/4* é observado nas posições 9, 10 e 12 e o 6*/6* na 11; e nas posições 14 a 18, o perfil RFLP *XhoII* do *NAT2**7, mostrando o perfil 4*/4* em todas as posições.

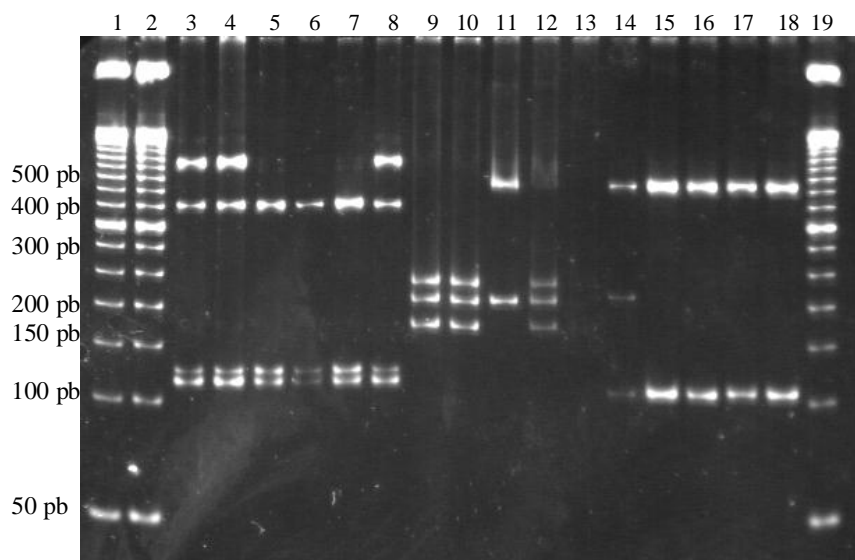


Figura 4. Perfis de RFLP dos polimorfismos *NAT2* separados em gel de poliacrilamida 8% (150V, 15mA, 4h) corado com SYBR Gold. Posições 1, 2 e 19: marcador de tamanho molecular de DNA de 50pb. Posições 3 a 8: polimorfismo *NAT2*5* (*EcoRI*), onde o genótipo **4/4** é observado nas posições 5 a 7 e o **4/5** nas posições 3, 4 e 8; posições 9 a 13: polimorfismo *NAT2*6* (*TaqI*), onde o genótipo **4/4** é observado nas posições 9, 10 e 12 e o **6/6** na 11; posições 14 a 18: polimorfismo *NAT2*7* (*XhoI*), mostrando o perfil *4*/4** em todas as posições.

3.7. Pesquisa de variantes do *CYP2E1* por PCR-RFLP

Para o estudo dos polimorfismos *CYP2E1*1B* (*rs 2070676*) e *CYP2E1*5* (*rs 2070675*) por PCR-RFLP, dois pares de iniciadores foram escolhidos com base na seqüência disponível no GeneBank (Número de acesso: JO2843; www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se o programa Primer Premier versão 5.00 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, EUA).

As seqüências dos polimorfismos *CYP2E1*1B* e *CYP2E1*5* são reconhecidas pelas endonucleases *RsaI* e *AluI*, respectivamente. Na tabela 10, encontram-se as seqüências de reconhecimento das enzimas *RsaI* e *AluI*.

Tabela 10. Dados para detecção dos polimorfismos *CYP2E1* por PCR-RFLP.

| Polimorfismos | Enzima de restrição | Seqüência de reconhecimento | Posição do sítio de reconhecimento (*) | |
|------------------|---------------------|-----------------------------|--|--------|
| <i>CYP2E1*5</i> | <i>RsaI</i> | GT [^] AC | polimórfico | 1053pb |
| | | | constitutivo | 1696pb |
| <i>CYP2E1*1B</i> | <i>AluI</i> | AG [^] CT | polimórfico | 1293pb |
| | | | constitutivo | 1326pb |

(*) Código de acesso GI J02843 (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Os ensaios de PCR foram realizados em tubos de 0,2 mL contendo 50 ng de DNA, iniciadores 200 nM (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA), dNTPs 200 mM (Pharmacia Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), *Taq* DNA polimerase 1 U e tampão de PCR [Tris-HCl 75 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM] (Biotools B&M Labs, Madrid, Espanha).

A PCR foi realizada em termociclador PTC-200TM (MJ Research, Inc., Waltham, MA, EUA) com o seguinte programa: ciclo inicial de 94°C por 5 min; 28 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min; e ciclo final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídeo e os resultados foram documentados como descrito anteriormente.

Os ensaios de RFLP foram realizados por incubação do produto de PCR com 2U das endonucleases *AluI* (New England, BioLabs, EUA) e *RsaI* (New

England, BioLabs, EUA) por 4 h a 37°C. Os produtos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, em TBE 1X, a 150 V, 15 mA, por 4h. Como referência foi utilizado marcador de tamanho molecular de DNA 50 pb (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). O gel foi corado com SYBR Gold 100 ng/mL e os produtos de RFLP foram detectados e documentados como descrito anteriormente.

Na figura 5, são apresentados os perfis RFLP *CYP2E1*1B*. Nas posições 2, 5 a 7, 11 a 15 e 17 a 20, podemos observar o perfil do genótipo **1A/*1A* e nas posições 3, 4, 8 a 10 e 16, encontra-se o perfil do genótipo **1A/*1B*.

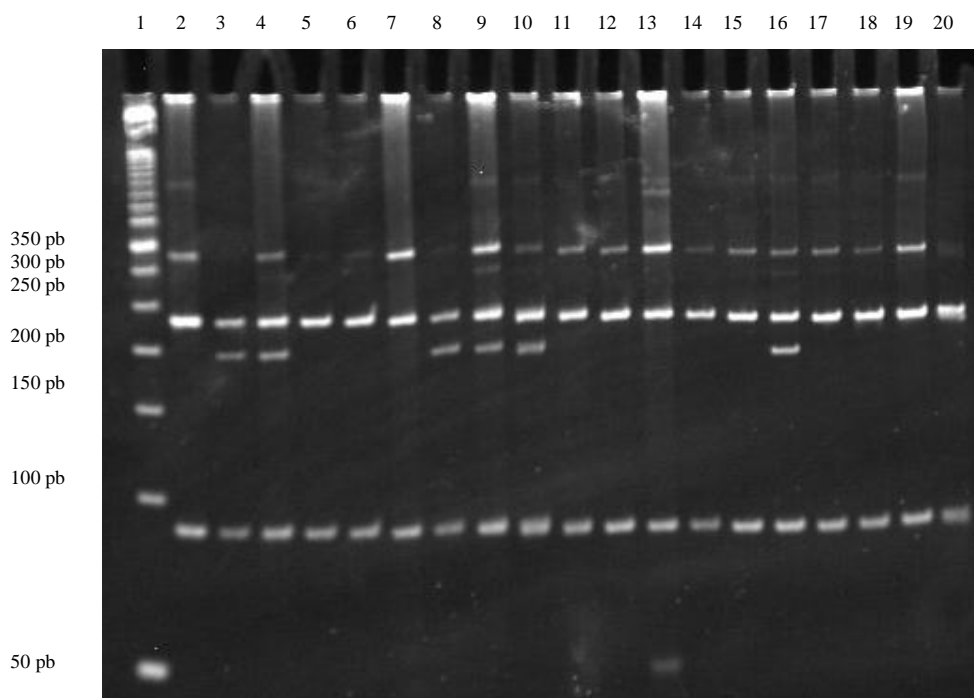


Figura 5. Perfis de RFLP do *CYP2E1*1B* separados em gel de poliacrilamida 8% (150V, 15mA, 4h) corado com SYBR Gold. Posições 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb. Posições 2, 5 a 7, 11 a 15 e 17 a 20: genótipo **1A/*1A*. Posições 3, 4, 8 a 10 e 16: genótipo **1A/*1B*.

Na figura 6, são apresentados os perfis de RFLP *CYP2E1*5*. Nas posições 7 e 11, podemos observar o perfil do genótipo **1A/*5* do *CYP2E1*5*, e nas posições restantes, é mostrado o perfil do genótipo **1A/*1A*.

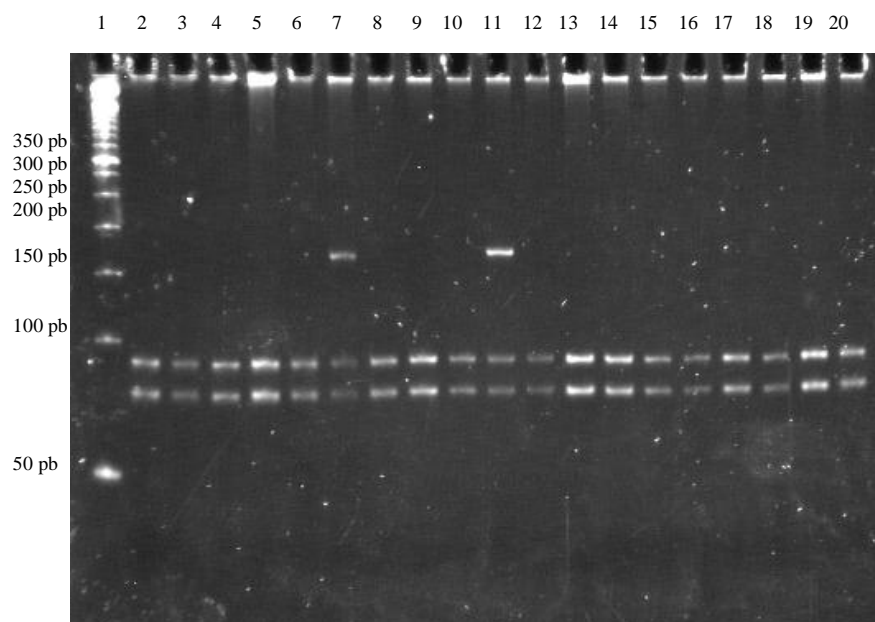


Figura 6. Perfis de RFLP do *CYP2E1*5* separados em gel de poliacrilamida 8% (150V, 15mA, 4h) corado com SYBR Gold. Posição 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb. Posições 7 e 11: genótipo **1A/*5*. Posições 2 a 6, 8 a 10 e 12 a 20: genótipo **1A/*1A*.

3.8. Pesquisa de polimorfismos *NAT2* por seqüenciamento de DNA

Os polimorfismos do *NAT2* também foram pesquisados por seqüenciamento de DNA. Para essa finalidade foram selecionados quatro pares de iniciadores (NATF1R1 a NATF4R4) com base na seqüência do *NAT2* (Número de acesso: 11321494, www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se o programa Primer Premier. Estes iniciadores flanqueiam quatro regiões do *NAT2* em toda a sua

extensão incluindo 170pb antes do início do gene e 152pb após o final do gene (Figura 7).

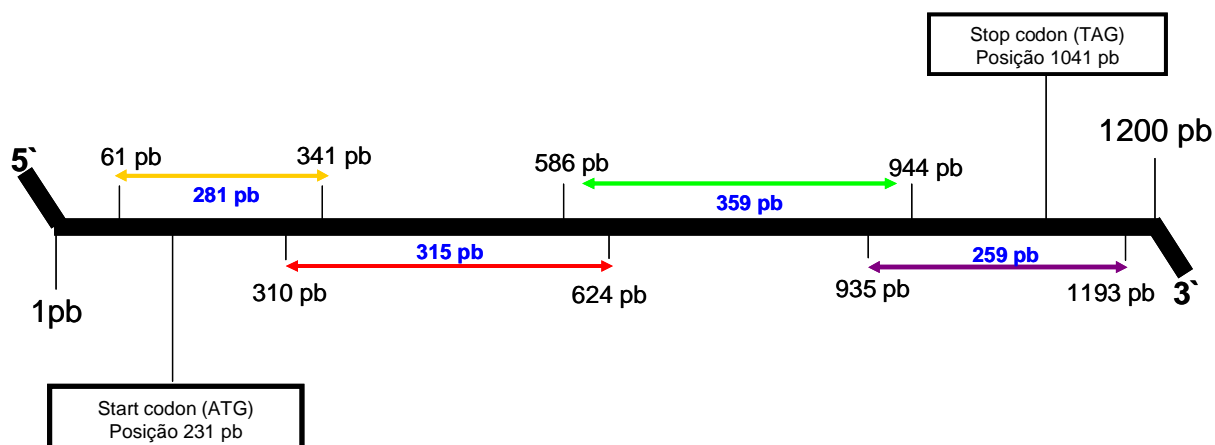


Figura 7. Esquema ilustrativo da estratégia de sequenciamento do *NAT2*. As setas coloridas indicam a posição dos 4 pares de iniciadores para a amplificação do gene em toda a sua extensão.

As condições dos ensaios de PCR foram estabelecidas para cada par de iniciadores variando-se a temperatura de hibridização (gradiente de 50°C a 65°C), o número de ciclos de cada reação (de 28 a 31 ciclos) e a concentração de cada iniciador (8 a 10 μ M). Após os testes, foram determinadas as condições adequadas conforme mostrado na tabela 11. Na figura 8, podem ser observados os produtos gerados nos ensaios de PCR.

Tabela 11. Condições dos ensaios de PCR para amplificação do *NAT2*.

| Produtos | Temperatura de hibridização | Número de Ciclos | Concentração final de iniciadores |
|----------|-----------------------------|------------------|-----------------------------------|
| NAT2F1R1 | 57°C | 28 | 10 µM |
| NAT2F2R2 | 57°C | 28 | 8 µM |
| NAT2F3R3 | 59°C | 28 | 8 µM |
| NAT2F4R4 | 51°C | 30 | 8 µM |

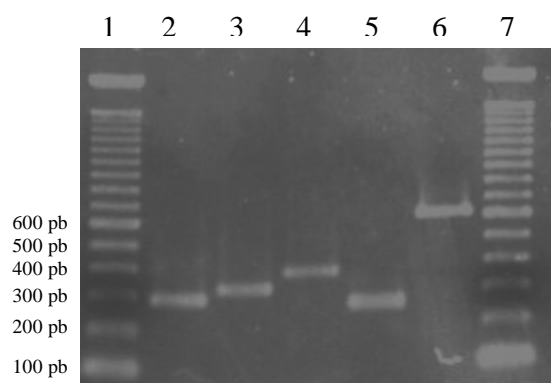


Figura 8. Produtos de PCR do *NAT2* para sequenciamento de DNA. Gel de Agarose 1% (100V, 60mA, 30min) corado com brometo de etídeo. Posição 1 e 7: marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb. Posições 2 a 6: produtos de PCR NAT2F1R1, NAT2F2R2, NAT2F3R3, NAT2F4R4 e NAT2F3R4, respectivamente.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se os kits *GFX PCR DNA* e *Gel Band purification kit* (GE Healthcare Biosciences, Buckinghamshire, UK), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 2% em cuba eletroforética Horizon 58 (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA) realizada a 100V durante 30min utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Suécia) em tampão TBE 0,5X (composição previamente descrita). Como referência um marcador de massa molecular de DNA foi utilizado (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, EUA). O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (300 ng/mL) e documentado como descrito anteriormente.

Os produtos purificados foram seqüenciados no Laboratório de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo, utilizando-se o sistema de separação de DNA de 96 capilares MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, Brasil). As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* que contem a Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase (Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, Brasil). Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando-se o aplicativo *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 5.0.9 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Caroline State University, EUA).

Os eletroferogramas das reações de seqüenciamento dos SNPs *NAT2*5* (C481T), *NAT2*6* (G590A) e *NAT2*7* (G857A) são mostrados nas figuras 9, 10 e

11 respectivamente. Os portadores do alelo comum *NAT2**4 apresentaram as seqüências dos alelos 481C, 590G e 857G confirmando os resultados obtidos na genotipagem por RFLP. A seqüência do alelo *NAT2**5 (alelo 481T) foi confirmada pela detecção de A na fita reversa do seqüenciamento (Figura 9-B). A seqüência do alelo *NAT2**6 (alelo 590A) foi confirmada pela detecção de T na fita reversa do seqüenciamento (Figura 10-B). A seqüência do alelo *NAT2**7 (alelo 857A) foi confirmada pela detecção de A na fita reversa do seqüenciamento (Figura 11-B).

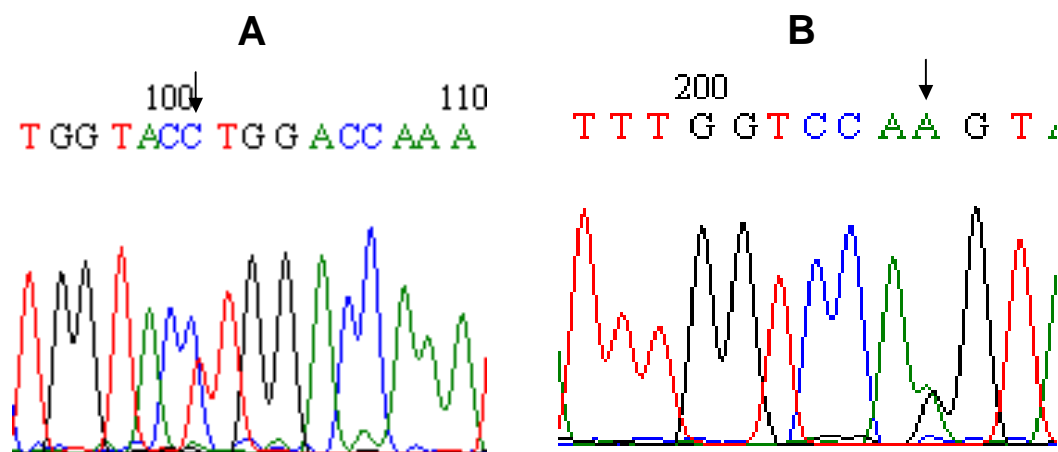


Figura 9. Eletroferograma representativo da análise de seqüência do alelo *NAT2**5. **A.** Seqüência do alelo comum *NAT2**4 (alelo 481C). **B.** Seqüência com substituição de G por A (na fita reversa do seqüenciamento) que caracteriza a substituição de C por T na posição 481pb (alelo *NAT2**5), em heterozigose.

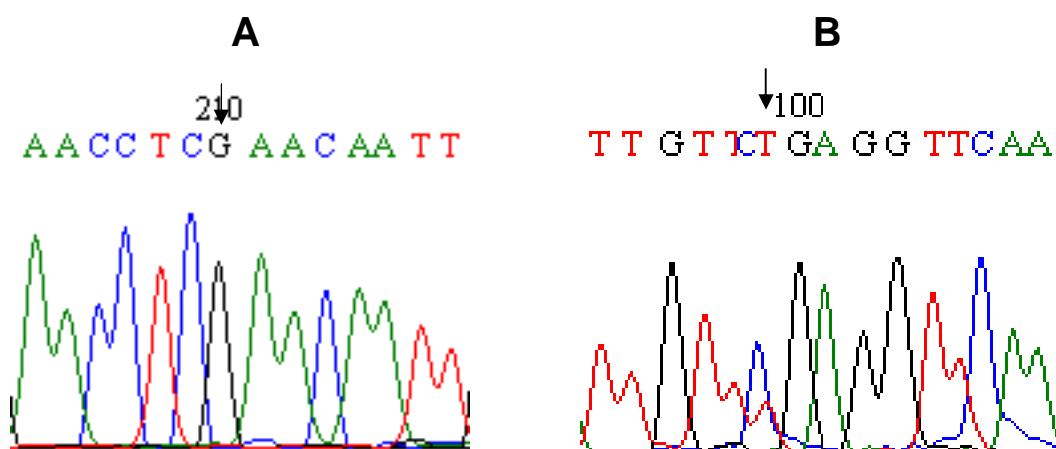


Figura 10. Eletroferograma representativo da análise de seqüência do alelo *NAT2*6*. **A.** Seqüência do alelo comum *NAT2*4* (alelo 590G). **B.** Seqüência com substituição de C para T (na fita reversa do seqüenciamento) que caracteriza a substituição de G por A na posição 590pb (alelo *NAT2*6*), em heterozigose.

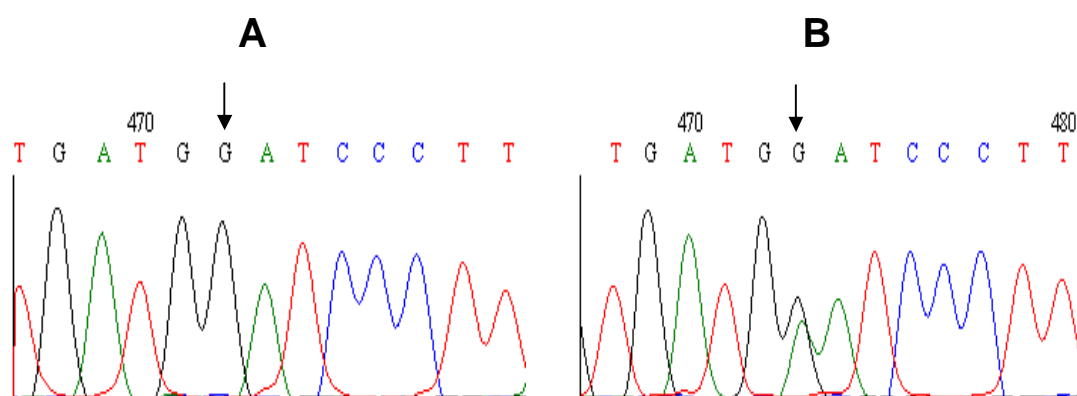


Figura 11. Eletroferograma representativo da análise de seqüência do alelo *NAT2*7*. **A.** Seqüência do alelo comum *NAT2*4* (alelo 857G). **B.** Seqüência indicativa da substituição de G para A (na fita reversa do seqüenciamento) na posição 857pb (alelo *NAT2*7*), em heterozigose.

3.9. Pesquisa de polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* por PCR *multiplex*

Para o estudo dos polimorfismos *GSTM1**1 e *GSTT1**1, dois pares de iniciadores (*GSTM1F/GSTM1R*, *GSTT1F/GSTT1R*) foram selecionados com base nas seqüências disponível no GeneBank (Números de acesso: GI 23065546 e GI 4504184, respectivamente, www.ncbi.nlm.nih.gov). Para controle interno da PCR *multiplex* foi amplificada simultaneamente a região que contém o polimorfismo *CYP2E1**5.

Com o objetivo de estabelecer as concentrações ideais dos reagentes de PCR e as condições ideais de temperaturas de hibridização dos iniciadores e dos números de ciclos de amplificação, foram realizados estudos baseados em trabalhos descritos previamente (BELL *et al.*, 1993; HUANG *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 1996).

Os ensaios de PCR foram realizados em tubos de 0,2mL contendo 50ng de DNA, 100nM de cada iniciador (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA), dNTPs 200 mM (Pharmacia Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), DNA polimerase 1 U e tampão de PCR (Biotools B&M Labs, Madrid, Espanha). A PCR foi realizada em termociclador PTC-200TM (MJ Research, Inc., Waltham, MA, EUA), programado da seguinte maneira: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (100V, 60mA, 45min) em TBE 0,5X, visualizados e documentados como descrito anteriormente. Como referencia foi utilizado um marcador de DNA de 100pb (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

Na PCR *multiplex*, os genótipos *GSTM1*1* e *GSTT1*1* são amplificados conjuntamente, gerando produtos de 273pb (*GSTM1*1*) e 480pb (*GSTT1*1*) (Figura 12). O produto de 182 pb corresponde à amplificação de um segmento do *CYP2E1* que foi incluído como controle interno da reação para evitar erros de interpretação na deleção do *GSTM1*0* ou *GSTT1*0* (genótipos nulos). A deleção do *GSTM1*0* pode ser observada na figura 12 (posição 2).

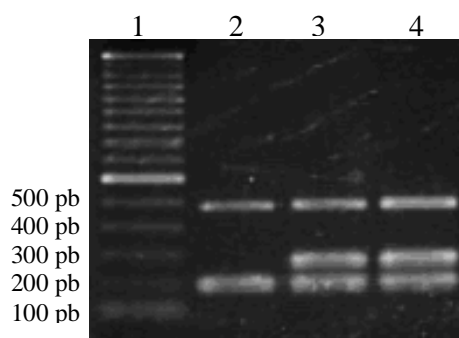


Figura 12. Produtos de PCR *multiplex* para análise dos genótipos *GSTM1*1* e *GSTT1*1*. Gel de agarose 1% (100V, 60mA, 45min) corado com brometo de etídeo. Posição 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb. Posição 2: ausência do genótipo *GSTM1* (*GSTM1*0*). Posições 3 e 4: presença de genótipos *GSTM1* (*GSTM1*1*) e *GSTT1* (*GSTT1*1*). A banda de 182pb indica amplificação do *CYP2E1* (controle interno).

3.10. Análise estatística dos resultados

Os dados quantitativos foram expressos como a média \pm DP (desvio padrão). As comparações de distribuições das freqüências gênicas e genotípicas e as associações entre as variáveis categóricas foram analisadas pelo teste qui-quadrado e Teste Exato de Fischer. Qui-quadrado também foi utilizado para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As variáveis numéricas (quantitativas) foram comparadas pelos teste *t* de Student e Análise de Variância (ANOVA). Para

comparações de parâmetros bioquímicos durante o tratamento foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas e o teste de Dumm's para análise de comparações múltiplas. O coeficiente de correlação para postos de Spearman foi utilizado para as análises de correlações dos parâmetros bioquímicos. Regressão Logística foi utilizada para a análise da relação entre as variáveis dependentes binárias com as independentes.

Para a aplicação desses testes foi utilizado os programas de estatística SigmaStat v. 2.0. (San Rafael, CA), Minitab v. 14 (Minitab Inc., USA), R 2.7.1 (Viena, Áustria) e SPSS v. 15 (Chicago, Illinois). Foi considerado o nível de significância estatística de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes

Na tabela 12, são apresentados os dados dos pacientes incluídos no estudo. A idade média dos pacientes foi de 36,7 ($\pm 12,8$) anos com distribuição semelhante de homens (53,5%) e mulheres (46,7%). Entre os indivíduos que declararam sua etnia, obtida conforme recomendação do IBGE (www.ibge.gov.br) houve predomínio de indivíduos brancos (60,6%).

Dos 99 pacientes com tuberculose incluídos no estudo, 48 apresentaram baciloscopia e cultura positiva para *M. tuberculosis*; 9 tinham somente cultura positiva e 10 tinham apenas baciloscopia positiva antes do início do tratamento. Baciloscopia e cultura negativa foram encontradas em 15 pacientes, porém o diagnóstico de tuberculose pulmonar foi baseado nos sinais e sintomas clínicos (febre, emagrecimento, tosse com expectoração por mais de 3 semanas), prova tuberculínica e radiografia positivas. Outros 17 pacientes não realizaram baciloscopia e cultura por apresentarem tuberculose cutânea, ganglionar, oftálmica e pleural.

Tabela 12. Dados biodemográficos, diagnósticos e terapêuticos dos pacientes incluídos no estudo.

| Variável | TB positiva (99) | TB pulmonar (82) | TB extra-pulmonar (17) |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------------|
| Idade (Anos) | 36,7 ± 12,8 | 36,7 ± 12,9 | 36,5 ± 11,7 |
| Gênero masculino | 53,5% (53) | 52,4% (43) | 58,8% (10) |
| Etnia | | | |
| Branco | 60,6% (60) | 63,4% (52) | 47,1% (8) |
| Não Branco | 39,4% (39) | 36,6% (30) | 52,9% (9) |
| Tratamento | | | |
| Esquema 1* | 66,7% (66) | 62,2% (51) | 88,2% (15) |
| Outros esquemas** | 33,3% (33) | 37,8% (31) | 11,8% (2) |
| Etilismo | | | |
| Sim | 7,1% (7) | 6,1% (5) | 11,8% (2) |
| Não | 92,9% (92) | 93,9% (77) | 88,2% (15) |
| Medicação Concomitante*** | | | |
| Sim | 57,6% (57) | 64,6% (53) | 23,5% (4) |
| Não | 42,4% (42) | 35,4% (29) | 76,5% (13) |

Número de indivíduos entre parênteses. TB: tuberculose.

(*) Número de pacientes que foram tratados somente com E1

(**) Número de pacientes que iniciaram o tratamento com E1 e passaram para outros esquemas como: E1R ou E3 ou SEO (3SEOFX / EOFX) ou SHE (3SHE / 9HE) ou SER (2SRE / 4RE)

(***) Presença de medicação concomitante define-se como pelo menos o uso de um fármaco, diferente daqueles utilizados para o tratamento da tuberculose.

Na tabela 13, são apresentados os dados de marcadores bioquímicos dos pacientes que retornaram para a coleta antes e após 2, 4 e 6 meses de tratamento. Antes do tratamento (basal), os valores médios de ALT, ALP, Bilirrubina direta, Bilirrubina total e creatinina estavam dentro dos limites de referência do laboratório, enquanto que os valores de AST e GGT estavam acima

dos limites de referência para 12 e 11 indivíduos, respectivamente, sendo que 4 indivíduos, para ambos os parâmetros, foram classificados como etilistas.

Alterações próximas de duas vezes o LSR foram observadas após 2 meses de tratamento para os valores médios de ALT (116,2 U/L) e AST (97,0 U/L). No 4º mês de tratamento, os valores médios de ALT (55,9 U/L) e AST (57,9 U/L), ainda permaneciam acima do LSR, porém apresentaram acentuada queda em relação ao segundo mês de tratamento. No 6º mês, os valores de ALT e AST atingiram os limites de normalidade.

No 2º mês de tratamento, a média de ALP sérica (188,7 U/L) aumentou uma vez o LSR. No 4º mês de tratamento observamos redução de ALP em 57% em comparação com o 2º mês de tratamento. No 6º mês de tratamento observa-se que o valor médio de ALP retornou para a faixa de normalidade.

Os valores médios do parâmetro GGT (156,2 U/L) e (148,8 U/L), respectivamente, no 2º e 4º mês de tratamento apresentaram-se acima de 2 vezes o LSR. No sexto mês, o valor médio de GGT retornou à normalidade.

Alterações semelhantes ocorreram para os valores médios de bilirrubina direta (alterações de até 10 vezes) e bilirrubina total (aumento de 8 vezes) no 2º mês de tratamento. No 4º mês, as bilirrubinas permaneceram alteradas em no máximo uma vez o LSR, retornando a faixa de normalidade no 6º mês de tratamento.

O parâmetro creatinina não apresentou elevações médias acima do LSR em nenhum período do tratamento (2, 4 e 6 meses).

Quando se aplica o teste de Dumm's para a análise de comparações múltiplas, observa-se que os valores médios de ALT, AST, ALP, GGT e bilirrubina direta, no 2º mês de tratamento, foram significativamente superiores aos valores médios do pré-tratamento (basal) (Tabela 13). Além disso, os valores médios de ALT e AST, no 6º mês de tratamento, foram inferiores aos valores médios encontrados no 2º mês de tratamento.

Tabela 13. Dados de perfil bioquímico sérico dos pacientes incluídos no estudo que retornaram para as coletas, antes e após o tratamento com antimicobacterianos.

| Variável | Tempo de tratamento | | | | <i>p</i> | Intervalo de referência |
|----------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------|--------------------------------|----------|-------------------------|
| | Basal (81) | 2 meses (67) | 4 meses (58) | 6 meses (76) | | |
| ALT (U/L) | 38,2 ± 24,0 | 116,2 ± 247,4^a | 55,9 ± 72,5 | 28,9 ± 14,7^b | 0,002 | 9,0 – 52,0 U/L |
| AST (U/L) | 38,9 ± 44,3 | 97,0 ± 166,7^a | 57,9 ± 74,7 | 26,4 ± 9,2^b | <0,001 | 14,0 – 36,0 U/L |
| ALP (U/L) | 112,9 ± 29,9 | 188,7 ± 153,9^a | 145,5 ± 108,3 | 90,8 ± 40,2 | 0,007 | 38,0 – 126,0 U/L |
| GGT (U/L) | 85,4 ± 139,2 | 156,2 ± 144,3^a | 148,8 ± 190,7 | 60,7 ± 58,3 | 0,028 | 15,0 ± 73,0 U/L |
| Bilirrubina direta (mg/dL) | 0,3 ± 0,2 | 1,6 ± 3,3^a | 0,6 ± 1,0 | 0,3 ± 0,1 | 0,016 | 0,1 – 0,4 mg/dL |
| Bilirrubina total (mg/dL) | 0,8 ± 0,5 | 2,7 ± 5,2 | 1,3 ± 1,6 | 0,9 ± 0,4 | 0,066 | 0,1 – 1,2 mg/dL |
| Creatinina (mg/dL) | 0,8 ± 0,2 | 0,7 ± 0,1^a | 1,0 ± 0,3 | 0,9 ± 0,3 | 0,034 | 0,6 -1,2 mg/dL |

Nota: ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato amino transferase; ALP: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamil transferase. Valores apresentados como média ± desvio-padrão e comparados utilizando-se teste de análise de variância (ANOVA).

a: Valores em negrito: $p < 0,05$ em relação ao basal. Método de múltiplas comparações (Dumm's Method)

b: Valores em negrito: $p < 0,05$ em relação ao 2 mês de tratamento. Método de múltiplas comparações (Dumm's Method)

Durante o tratamento com antimicobacterianos, 59,6% (n=60/99) dos pacientes incluídos no estudo, reportaram pelo menos uma RAM, tal como prurido, sonolência, dores articulares, febre ou gastrite.

No total, 174 RAMs foram reportadas, sendo que 14 pacientes relataram 1 RAM, 9 relataram 2 RAMs, 16 relataram 3 RAMs, 11 relataram 4 RAMs e 10 relataram 5 RAMs. Essas RAMs encontram-se agrupadas de acordo com os sistemas fisiológicos afetados, conforme descrito na tabela 14.

Tabela 14. Reações adversas a medicamentos (RAM) relatadas pelos indivíduos com tuberculose, durante o tratamento.

| Reações adversas | Tempo de tratamento | | | Total % (n) |
|---|---------------------|------------------|------------------|----------------|
| | 2 meses % (n) | 4 meses % (n) | 6 meses % (n) | |
| Gastrointestinais (gastrite, azia, náusea, vômitos) | 35,1 (61) | 5,2 (9) | 11,5 (20) | 51,7 (90) |
| Dermatológicos (descamação e prurido cutâneo) | 4,0 (7) | 2,3 (4) | 0,6 (1) | 6,9 (12) |
| Pulmonares (dispnéia) | 6,9 (12) | 1,1 (2) | 0,0 (0) | 8,0 (14) |
| Ocular / Visual (turvação da visão) | 0,0 (0) | 0,0 (0) | 1,7 (3) | 1,7 (3) |
| Dor (dores articulares) | 4,6 (8) | 2,3 (4) | 2,9 (5) | 9,8 (17) |
| Outras reações (inapetência, sonolência, febre) | 13,2 (23) | 1,7 (3) | 6,9 (12) | 21,9 (38) |
| Total (%) | 63,8 (111) | 12,6 (22) | 23,6 (41) | 100,0 (174) |

Nota: Número de reações adversas entre parênteses.

A maior parte das RAMs (63,8%) relatadas pelos pacientes ocorreu nos primeiros dois meses de tratamento (Figura 13), sendo que as RAM do sistema gastrointestinal estavam presentes em 51,7% dos casos (tabela 14).

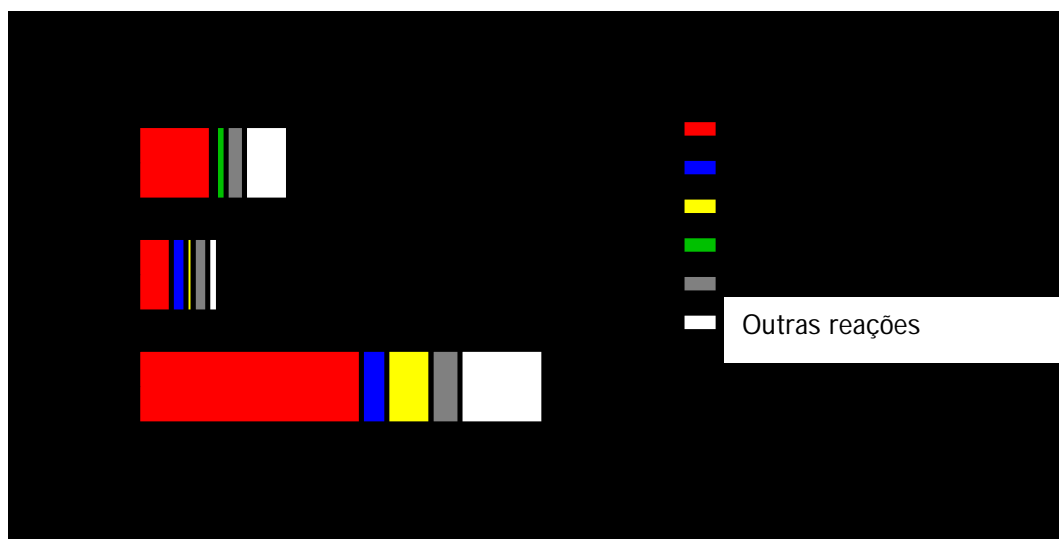


Figura 13. Frequências de reações adversas a medicamentos (RAMs) encontradas nos indivíduos com tuberculose.

A relação entre as características biodemográficas e clínicas dos indivíduos com tuberculose e a manifestação de RAM foi analisada por qui-quadrado e os resultados são apresentados na tabela 15.

Quando foi avaliado o uso de medicação concomitante, observou-se que 56,5% (n= 56) dos pacientes selecionados para esse estudo utilizaram alguma medicação concomitante em conjunto ao tratamento para tuberculose.

A frequência de RAM foi maior no grupo de indivíduos que fazia uso de medicação concomitante (72,8%) comparado com o grupo que não utilizou

nenhuma medicação concomitante (27,1%, $p < 0,001$) (Tabela 15). O risco de RAM foi 5,6 vezes maior para os indivíduos em uso de medicação concomitante (OR: 5,6; 95% Intervalo de Confiança: 2,98-10,45, $p < 0,001$). Para as demais variáveis, não foi encontrada relação com RAM ($p > 0,05$).

Tabela 15. Relação entre RAM e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose.

| Variável | RAM | | |
|-------------------------------|------------|------------|-------------------------------|
| | Sim (59) | Não (40) | |
| Gênero | | | |
| Masculino | 49,2% (29) | 60,0% (24) | $\chi^2 = 1,128, p = 0,288$ |
| Feminino | 50,8% (30) | 40,0% (16) | |
| Idade | | | |
| <50 anos | 86,4% (51) | 80,0% (32) | $\chi^2 = 0,332, p = 0,565$ |
| ≥50 anos | 13,6% (8) | 20,0% (8) | |
| Etnia | | | |
| Branços | 66,1% (39) | 52,5% (21) | $\chi^2 = 1,128, p = 0,223$ |
| Não Brancos | 33,9% (20) | 47,5% (19) | |
| Etilismo | | | |
| Sim | 5,1% (3) | 10,0% (4) | $\chi^2 = 0,877, p = 0,349$ |
| Não | 94,9% (56) | 90,0% (36) | |
| Medicação Concomitante | | | |
| Sim | 72,8% (43) | 32,5% (13) | $\chi^2 = 16,121 / p < 0,001$ |
| Não | 27,1% (16) | 67,5% (27) | |

Número de pacientes entre parênteses. RAM: reação adversa a medicamentos.

Na tabela 16, são apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento, em pacientes com e sem RAM. No período basal, os valores médios desses parâmetros foram similares entre os grupos com e sem RAM ($p > 0,05$). Porém, no 2º mês de tratamento, o grupo com RAM apresentou todos os marcadores bioquímicos aumentados, exceto creatinina, quando comparados com os indivíduos sem RAM ($p < 0,05$).

Nas figuras 14 a 17, é possível observar o perfil das variáveis bioquímicas dos pacientes, durante o tratamento com antimicobacterianos. Nos pacientes sem RAM, não foram observadas diferenças significativas nos valores séricos de ALT e AST (Fig. 14), ALP e GGT (Fig. 15), bilirrubinas (Fig. 16) e creatinina (Fig. 17) durante o tratamento ($p > 0,05$). Por outro lado, os pacientes com RAM apresentaram aumento de todas as variáveis bioquímicas no 2º mês de tratamento comparado com o basal, com exceção da creatinina.

Esses resultados indicam que a presença de RAM no 2º mês de tratamento é acompanhada por alteração dos marcadores de lesão hepatocelular (ALT e AST) e colestase (bilirrubinas, ALP e GGT) sugerindo que a hepatotoxicidade é a principal RAM encontrada durante o tratamento farmacológico dos pacientes com tuberculose.

Tabela 16. Dados de perfil bioquímico de indivíduos com tuberculose que apresentaram ou não reações adversas a medicamentos (RAM).

| Variável | | Basal | Tempo de tratamento | | | Valor de referência |
|----------------------------|----------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------------|
| | | | 2 meses | 4 meses | 6 meses | |
| ALT (U/L) | Com RAM | 39,4 ± 25,6 | 140,7 ± 279,7 | 59,9 ± 76,1 | 28,1 ± 16,8 | 9,0 – 52,0 U/L |
| | Sem RAM | 36,6 ± 22,3 | 37,3 ± 12,7 | 24,7 ± 14,5 | 30,8 ± 9,0 | |
| | <i>P</i> | 0,297 | 0,011^a | 0,749 | 0,667 | |
| AST (U/L) | Com RAM | 45,9 ± 56,6 | 118,2 ± 186,2 | 62,3 ± 78,4 | 26,7 ± 10,4 | 14,0 – 36,0 U/L |
| | Sem RAM | 29,4 ± 15,3 | 28,3 ± 13,0 | 24,3 ± 9,4 | 25,7 ± 6,1 | |
| | <i>P</i> | 0,099 | 0,013^a | 0,669 | 0,449 | |
| ALP (U/L) | Com RAM | 114,2 ± 26,1 | 224,6 ± 172,5 | 150,3 ± 117,4 | 94,4 ± 46,9 | 38,0 – 126,0 U/L |
| | Sem RAM | 111,3 ± 35,1 | 134,9 ± 109,4 | 121,7 ± 45,8 | 82,8 ± 21,0 | |
| | <i>P</i> | 0,331 | 0,018^a | 0,767 | 0,026^b | |
| GGT (U/L) | Com RAM | 112,2 ± 178,5 | 172,2 ± 161,8 | 166,7 ± 199,7 | 68,1 ± 65,1 | 15,0 ± 73,0 U/L |
| | Sem RAM | 50,4 ± 44,1 | 122,0 ± 99,0 | 35,3 ± 19,5 | 40,0 ± 28,3 | |
| | <i>P</i> | 0,136 | 0,022^a | 0,111 | 0,186 | |
| Bilirrubina direta (mg/dL) | Com RAM | 0,3 ± 0,3 | 2,0 ± 3,7 | 0,7 ± 1,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,1 – 0,4 mg/dL |
| | Sem RAM | 0,3 ± 0,2 | 0,4 ± 0,2 | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,2 | |
| | <i>P</i> | 0,288 | 0,004^a | 0,679 | 0,950 | |
| Bilirrubina total (mg/dL) | Com RAM | 0,8 ± 0,6 | 3,3 ± 5,9 | 1,4 ± 1,7 | 0,9 ± 0,4 | 0,1 – 1,2 mg/dL |
| | Sem RAM | 0,8 ± 0,4 | 0,8 ± 0,3 | 0,9 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | |
| | <i>P</i> | 0,313 | 0,007^a | 0,667 | 0,896 | |
| Creatinina (mg/dL) | Com RAM | 0,8 ± 0,2 | 0,7 ± 0,1 | 1,0 ± 0,3 | 0,9 ± 0,4 | 0,6 -1,2 mg/dL |
| | Sem RAM | 0,8 ± 0,3 | 0,6 ± 0,2 | 0,9 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | |
| | <i>p</i> | 0,613 | 0,048^a | 0,125 | 0,385 | |

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato amino transferase; ALP: fosfatase alcalina; GTT: gama-glutamil transferase.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão e comparados utilizando-se teste de análise de variância (ANOVA).

a: Valores em negrito: $p < 0,05$ em relação ao basal. Método de múltiplas comparações (Dumm's Method)

b: Valores em negrito: $p < 0,05$ em relação ao 2 mês de tratamento. Método de múltiplas comparações (Dumm's Method)

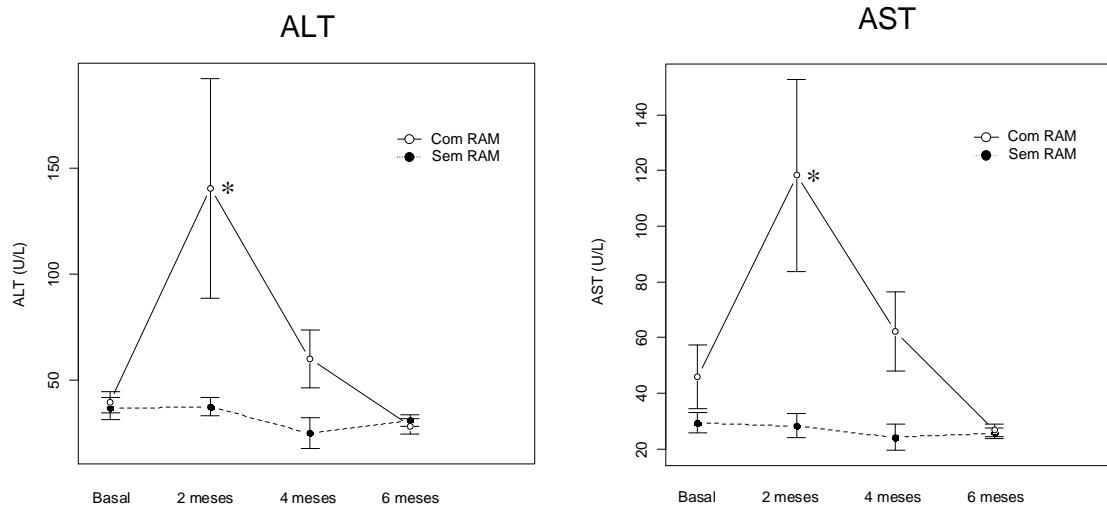


Figura 14. Valores de transaminases séricas de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. Resultados são expressos como média \pm DP e comparados por ANOVA. * $p < 0,05$ quando comparado com basal.

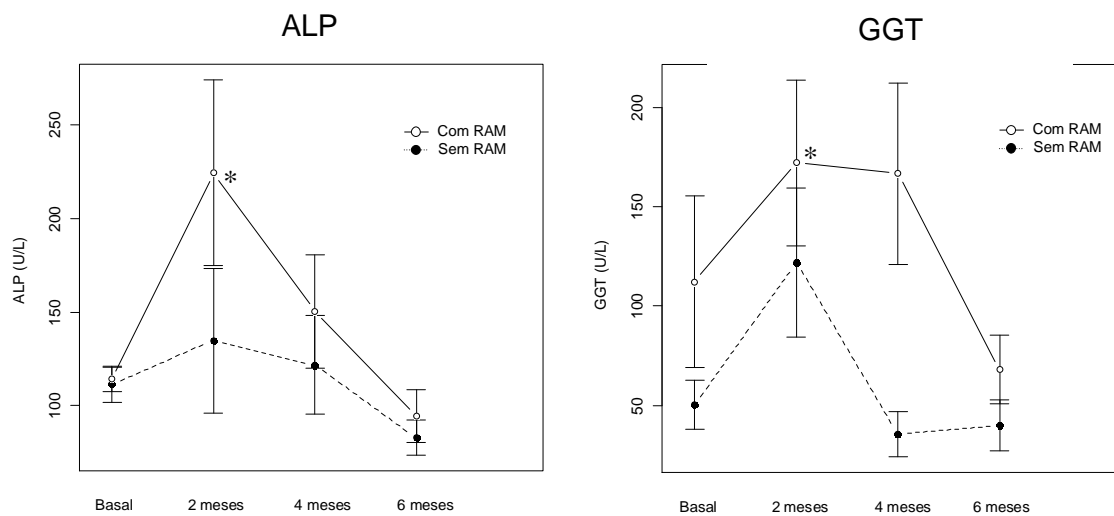


Figura 15. Valores de ALP e GGT séricas de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. Resultados são expressos como média \pm DP e comparados por ANOVA. * $p < 0,05$ quando comparado com basal.

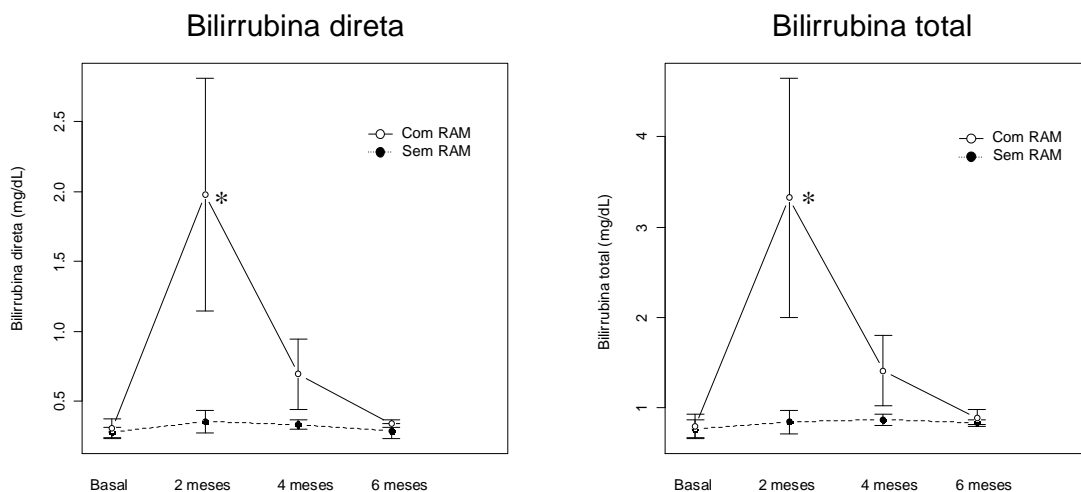


Figura 16. Valores de bilirrubina direta e total séricas de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. Resultados são expressos como média \pm DP e comparados por ANOVA. * $p < 0,05$ quando comparado com basal.

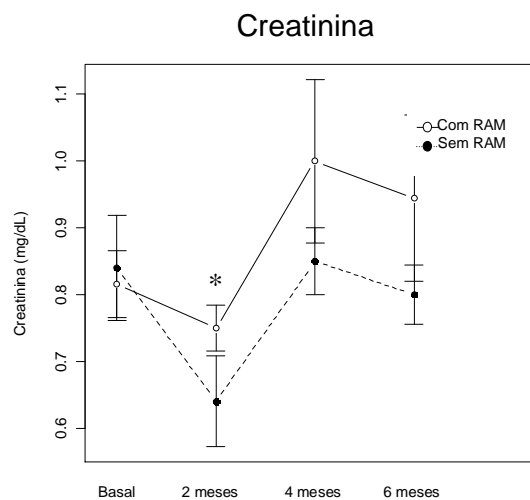


Figura 17. Valores de creatinina de pacientes com tuberculose com ou sem RAM durante o tratamento com antimicobacterianos. Resultados são expressos como média \pm DP e comparados por ANOVA. * $p < 0,05$ quando comparado com basal.

Estudos de correlações entre as variáveis bioquímicas no 2º e 4º meses de tratamento foram realizados. Para os parâmetros ALT, AST e ALP, observou-se correlação positiva com GGT no 2º mês de tratamento. Os parâmetros ALT, Bilirrubina direta e total no 2º mês, e ALT, AST e Bilirrubina total no 4º mês de tratamento estão correlacionadas positivamente com AST no 2º mês de tratamento. O parâmetro ALP no 2º mês, apresenta correlação com os valores de ALP no 4º mês, bem como o parâmetro GGT no 2º mês de tratamento apresenta correlação com os valores do 4º e 6º meses ($p= 0,02$ e $p= 0,04$, respectivamente) (Tabelas 17 e 18).

Uma correlação entre Bilirrubina direta no segundo mês de tratamento com Bilirrubina total (segundo mês de tratamento), e Bilirrubina direta e total no quarto mês de tratamento também foi observada. Por último, encontrou-se correlação entre GGT e Bilirrubina total mensuradas no quarto mês com os resultados de Bilirrubina total do segundo mês de tratamento. Nenhuma associação foi encontrada entre o parâmetro creatinina no segundo mês de tratamento com os demais parâmetros laboratoriais avaliados (Tabelas 17 e 18).

Tabela 17. Matriz de correlação dos parâmetros laboratoriais no segundo mês de tratamento *versus* todos os meses de tratamento.

| 2 meses de Tratamento | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|
| | <i>ALT</i> | <i>AST</i> | <i>ALP</i> | <i>GGT</i> | <i>Bilirrubina Direta</i> | <i>Bilirrubina Total</i> | <i>Creatinina</i> |
| <i>ALT 2M</i> | | 0,79 <i>p</i> < 0,01 | | | | | |
| <i>ALT 4M</i> | | 0,63 <i>p</i> < 0,01 | | | | | |
| <i>AST 4M</i> | | 0,73 <i>p</i> < 0,01 | | | | | |
| <i>ALP 4M</i> | | | 0,90 <i>p</i> = 0,04 | | | | |
| <i>GGT 2M</i> | 0,43 <i>p</i> = 0,04 | 0,53 <i>p</i> =0,01 | 0,52 <i>p</i> = 0,04 | | | | |
| <i>GGT 4M</i> | | | | 0,77 <i>p</i> = 0,02 | | 0,63 <i>p</i> = 0,04 | |
| <i>GGT 6M</i> | | | | 0,90 <i>p</i> = 0,04 | | | |
| <i>BD 2M</i> | | 0,50 <i>p</i> < 0,01 | | | | | |
| <i>BD 4M</i> | | | | | 0,91 <i>p</i> < 0,01 | | |
| <i>BT 2M</i> | | 0,49 <i>p</i> < 0,01 | | | 0,91 <i>p</i> < 0,01 | | |
| <i>BT 4M</i> | | 0,46 <i>p</i> = 0,05 | | | 0,91 <i>p</i> < 0,01 | 0,91 <i>p</i> < 0,01 | |

O Coeficiente de correlação de Spearman's está indicado em cada célula.

Tabela 18. Matriz de correlação dos parâmetros laboratoriais no quarto mês de tratamento *versus* todos os meses de tratamento.

| 4 meses de Tratamento | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | ALT | AST | ALP | GGT | Bilirrubina Direta | Bilirrubina Total | Creatinina |
| ALT 4M | | 0,86 $p < 0,01$ | | | | | |
| ALT 6M | 0,49 $p = 0,03$ | | | | | | |
| AST 6M | | 0,50 $p = 0,03$ | | | | | |
| ALP 4M | | 0,60 $p = 0,01$ | | | | | |
| GGT 4M | 0,64 $p < 0,01$ | 0,79 $p < 0,01$ | 0,66 $p < 0,01$ | | 0,58 $p = 0,01$ | | |
| GGT 6M | | 0,60 $p = 0,05$ | 0,60 $p = 0,01$ | 0,88 $p < 0,01$ | | | |
| BD 4M | 0,81 $p < 0,01$ | 0,64 $p < 0,01$ | | | | | |
| BT 4M | 0,82 $p < 0,01$ | 0,70 $p < 0,01$ | | | 0,88 $p < 0,01$ | | |
| Creatinina 4M | | 0,89 $p < 0,01$ | | | | | |
| Creatinina 6M | | | | | | | 0,87 $p = 0,02$ |

O Coeficiente de correlação de Spearman's está indicado em cada célula.

Ao se analisar os mesmos parâmetros, porém para o quarto mês de tratamento, observa-se que o parâmetro AST encontra-se correlacionado positivamente com ALT, ALP, GGT, Bilirrubina direta, Bilirrubina total e creatinina no quarto mês de tratamento e com AST e GGT no sexto mês de tratamento. Os parâmetros GGT, Bilirrubina direta e indireta no quarto mês e ALT no sexto mês apresentam correlação com ALT no quarto mês de tratamento. Observam-se correlações entre GGT e ALP no quarto mês com GGT no sexto mês. Ainda se

encontram correlações positivas entre ALP e GGT no quarto mês de tratamento, bem com Bilirrubina direta e GGT e Bilirrubina total no mesmo mês de tratamento. Para o parâmetro creatinina avaliado no quarto mês somente foi identificada correlação nos valores do mesmo parâmetro no sexto mês de tratamento. Nenhuma associação foi encontrada entre o parâmetro Bilirrubina total no quarto mês de tratamento com os demais parâmetros laboratoriais avaliados.

Correlações no sexto mês de tratamento somente foram observadas para AST com os parâmetros ALT (fator de correlação 0,52; $p < 0,01$) e creatinina (fator de correlação 0,66; $p < 0,01$).

4.2. Resultados dos polimorfismos NAT2

Na tabela 19 são observadas a distribuição de genótipos e a freqüência de alelos das variantes do NAT2. Os genótipos mais freqüentes foram *4/*5, *5/*6, *4/*4 (de referência), *4/*6 e *5/*5, com freqüências de 27,3%, 16,2%, 15,2%, 14,1% e 12,1%, respectivamente. Os genótipos *6/*6, 4/*7, *5/*7 e *6/*7* foram os menos freqüentes e o genótipo *7/*7 não foi encontrado em nenhum paciente deste estudo.

Os alelos mais freqüentes foram NAT2*4 (37,9%) e NAT2*5 (35,8%) e os menos freqüentes foram NAT2*6 (21,7%) e NAT2*7 (4,5%). O grupo de estudo apresentou diferença na distribuição dos alelos (valor $p < 0,001$) em relação às freqüências alélicas encontradas por TEIXEIRA e colaboradores (2007). O alelo NAT2*4 foi mais freqüente no grupo de estudo e difere da freqüência encontrada na população brasileira ($p < 0,001$), enquanto que o alelo NAT2*6 teve freqüência menor no grupo de estudo quando comparado com a freqüência desse alelo na população brasileira (Tabela 19).

Tabela 19. Frequências genotípicas e alélicas das variantes *NAT2*.

| Variante | Frequência dos Genótipos* | Alelos | Frequência dos Alelos | | |
|-------------------|---------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|
| | | | Neste estudo** | Na população brasileira | |
| <i>NAT2</i> *4/*4 | 15,2% (15) | <i>NAT2</i> *4 | 37,9% (75) | 23,1% (161) | <i>p</i> < 0,001 |
| <i>NAT2</i> *4/*5 | 27,3% (27) | | | | |
| <i>NAT2</i> *4/*6 | 14,1% (14) | <i>NAT2</i> *5 | 35,8% (71) | 41,1% (286) | <i>p</i> = 0,18 |
| <i>NAT2</i> *4/*7 | 4,0% (4) | | | | |
| <i>NAT2</i> *5/*5 | 12,1% (12) | <i>NAT2</i> *6 | 21,7% (43) | 30,6% (213) | <i>p</i> = 0,01 |
| <i>NAT2</i> *5/*6 | 16,2% (16) | | | | |
| <i>NAT2</i> *5/*7 | 4,0% (4) | <i>NAT2</i> *7 | 4,5% (9) | 5,2% (36) | <i>p</i> = 0,71 |
| <i>NAT2</i> *6/*6 | 6,1% (6) | | | | <i>p</i> < 0,001 |
| <i>NAT2</i> *6/*7 | 1,0% (1) | | | | |

Nota: *Número de indivíduos entre parênteses.

**Número de alelos entre parênteses.

Frequência de alelos na população brasileira - TEIXEIRA *et al.*, 2007.

Equilíbrio Hardy-Weinberg (ZOU *et al.*, 2006):

NAT2 5* C481T SNP: $\chi^2 = 0,495$ (1gl, *p* > 0,05);

NAT2 6* G590A SNP: $\chi^2 = 0,453$ (1gl, *p* > 0,05);

NAT2 7* G857A SNP: $\chi^2 = 0,205$ (1gl, *p* > 0,05);

Os resultados da análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) avaliado pelo teste de qui-quadrado, indicam que as distribuições dos genótipos das variantes *NAT2*5*, *NAT2*6* e *NAT2*7* estão em HWE nesta amostra populacional ($p > 0,05$). Logo, o número de genótipos observados obedece à distribuição esperada para uma população em condições de equilíbrio. Desequilíbrio de ligação foi encontrado entre os polimorfismos *NAT2*5/*6* e *NAT2*6/*7* ($D' = 1,00$).

Na tabela 20 são mostradas as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *NAT2* nos grupos de indivíduos com tuberculose com ou sem RAM ou hepatotoxicidade. A hepatotoxicidade foi mais freqüente nos portadores do genótipo *NAT2*5/*6* (40,0%) (OR: 3,6; 95% Intervalo de Confiança: 0,92 - 14,26, $p = 0,018$) que nos demais indivíduos. Além disso, o genótipo funcional *NAT2*4/*4* estava presente apenas no grupo que não apresentou hepatotoxicidade (17,0%), indicando que a ausência do genótipo homozigoto funcional é um fator de risco para hepatotoxicidade.

Ao analisar os alelos, a frequência do alelo *NAT2*5* foi maior no grupo com RAM (42,4%) que no grupo sem RAM (26,3%), (OR: 2,7; 95% Intervalo de Confiança: 1,48 - 5,09, $p = 0,049$) (Tabela 20). Esse resultado é sugestivo de que o alelo *NAT2*5* está associado com um risco maior de apresentar RAM de 2,7 vezes.

Tabela 20. Freqüências genotípicas e alélicas de variantes *NAT2* em pacientes com tuberculose com RAM e com hepatotoxicidade.

| Genótipos | RAM | | Hepatotoxicidade* | |
|-------------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|------------|
| | Não (40) | Sim (59) | Não (88) | Sim (11) |
| <i>NAT2</i> *4/*4 | 22,5% (9) | 10,2% (6) | 17,0% (15) | 0,0% (0) |
| <i>NAT2</i> *4/*5 | 20,0% (8) | 32,2% (19) | 28,4% (25) | 10,0% (2) |
| <i>NAT2</i> *4/*6 | 17,5% (7) | 11,9% (7) | 14,8% (13) | 10,0% (1) |
| <i>NAT2</i> *4/*7 | 7,5% (3) | 1,7% (1) | 3,4% (3) | 10,0% (1) |
| <i>NAT2</i> *5/*5 | 5,0% (2) | 16,9% (10) | 11,4% (10) | 20,0% (2) |
| <i>NAT2</i> *5/*6 | 15,0% (6) | 16,9% (10) | 13,6% (12) | 40,0% (4) |
| <i>NAT2</i> *5/*7 | 7,5% (3) | 1,7% (1) | 4,6% (4) | 0,0% (0) |
| <i>NAT2</i> *6/*6 | 5,0% (2) | 6,8% (4) | 6,8% (6) | 0,0% (0) |
| <i>NAT2</i> *6/*7 | 0,0% (0) | 1,7% (1) | 0,0% (0) | 10,0% (1) |
| | $\chi^2 = 11,872$; $p = 0,157$ | | $\chi^2 = 18,519$; $p = 0,018$ | |
| Alelos | | | | |
| <i>NAT2</i> *4 | 45,0% (36) | 33,1% (39) | 37,9% (71) | 18,2% (4) |
| <i>NAT2</i> *5 | 26,3% (21) | 42,4% (50) | 35,8% (61) | 45,4% (10) |
| <i>NAT2</i> *6 | 21,3% (17) | 22,0% (26) | 21,7% (37) | 27,3% (6) |
| <i>NAT2</i> *7 | 7,5% (6) | 2,5% (3) | 4,5% (7) | 9,1% (2) |
| | $\chi^2 = 7,845$; $p = 0,049$ | | $\chi^2 = 4,647$; $p = 0,200$ | |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

*Hepatotoxicidade: foi considerada quando aminotransferases séricas (ALT ou AST) apresentava valores acima de três vezes o LSR, e/ou bilirrubina total acima de 2 mg/dL, de acordo com o Consenso Brasileiro de Tuberculose (FILHO *et al.*, 2004).

Os polimorfismos *NAT2* foram classificados em genótipos de acetilação rápida (*NAT2*4/*4*), intermediária (*NAT2*4/*5*, *NAT2*4/*6* e *NAT2*4/*7*) e lenta (*NAT2*5/*5*, *NAT2*5/*6*, *NAT2*5/*7*, *NAT2*6/*6* e *NAT2*6*7*) (SMITH *et al.*, 1997).

A frequência de genótipo de acetilação lenta foi maior no grupo de indivíduos com hepatotoxicidade (63,6%) que no grupo sem hepatotoxicidade (44,3%) (OR: 2,2; 95% Intervalo de Confiança: 0,60 - 8,06, $p < 0,001$) (Tabela 21). Esse resultado é sugestivo de que a presença do genótipo de acetilação lenta confere um risco 2,2 vezes maior de desenvolver hepatotoxicidade. Além disso, o genótipo funcional (rápido) não foi encontrado no grupo sem hepatotoxicidade, confirmando o seu efeito hepatoprotetor.

O genótipo de acetilação lenta também foi mais freqüente nos indivíduos com RAM (44,1%) que sem RAM (32,5%) (Tabela 21), porém a relação não foi significativa ($p = 0,201$).

Tabela 21. Frequências dos genótipos de acetilação da *NAT2* em pacientes com tuberculose de acordo com a presença de RAM e hepatotoxicidade.

| Genótipo de acetilação | RAM | | Hepatotoxicidade | |
|------------------------|---------------------------|------------|------------------------------|-----------|
| | Não (40) | Sim (59) | Não (88) | Sim (11) |
| Lento | 32,5% (13) | 44,1% (26) | 36,4% (32) | 63,6% (7) |
| Intermediário | 45,0% (18) | 45,8% (27) | 46,6% (41) | 36,4% (4) |
| Rápido | 22,5% (9) | 10,2% (6) | 17,0% (15) | 0,0% (0) |
| | $\chi^2 = 3,205; p=0,201$ | | $\chi^2 = 24,300; p < 0,001$ | |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

Genótipos de acetilação: rápida (*NAT2*4/*4*), intermediária (*NAT2*4/*5*, *NAT2*4/*6* e *NAT2*4/*7*) e lenta (*NAT2*5/*5*, *NAT2*5/*6*, *NAT2*5/*7*, *NAT2*6/*6* e *NAT2*6*7*)

Na tabela 22, são apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento com antimicobacterianos e a variação em porcentagem do segundo mês de tratamento com o período basal dos indivíduos portadores dos genótipos de acetilação rápido ($NAT2^{*4/*4}$), intermediário ($NAT2^{*4/*5}$, $NAT2^{*4/*6}$ e $NAT2^{*4/*7}$) e lento ($NAT2^{*5/*5}$, $NAT2^{*5/*6}$, $NAT2^{*5/*7}$, $NAT2^{*6/*6}$ e $NAT2^{*6/*7}$).

No período basal e nos meses subseqüentes de tratamento (2, 4 e 6 meses), os valores médios dos parâmetros bioquímicos analisados foram similares ($p > 0,05$) entre os grupos com os genótipos de acetilação rápido, intermediário e lento. Também não foram encontradas variações significativas entre o segundo, quarto e sexto meses de tratamento com o período basal dos indivíduos portadores dos genótipos de acetilação rápido, intermediário e lento.

Tabela 22. Dados de perfil bioquímico de indivíduos com tuberculose, antes e após o tratamento farmacológico, agrupados por genótipos de acetilação NAT2.

| Variável | NAT2 | Basal | Tempo de tratamento | | | % alteração Basal vs 2 meses |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------|---------------------|---------------|-------------|------------------------------|
| | | | 2 meses | 4 meses | 6 meses | |
| ALT (U/L) | *4/*4 | 35,0 ± 14,1 | 68,0 ± 41,9 / | 40,8 ± 38,9 | 28,7 ± 7,2 | 106,9 ± 71,9 |
| | *4/*5 + *4/*6 + *4/*7 | 35,9 ± 22,9 | 133,6 ± 358,5 | 71,9 ± 97,3 | 33,4 ± 19,5 | 98,8 ± 278,3 |
| | *5/*5 + *5/*6 + *5/*7 + *6/*6 + *6/*7 | 42,0 ± 26,9 | 109,3 ± 133,5 | 43,1 ± 42,5 | 24,9 ± 9,1 | 254,2 ± 403,2 |
| | <i>p</i> | 0,805 | 0,889 | 0,551 | 0,289 | 0,415 |
| AST (U/L) | *4/*4 | 74,5 ± 78,5 | 101,3 ± 84,0 | 44,7 ± 58,0 | 20,7 ± 4,2 | 129,2 ± 293,7 |
| | *4/*5 + *4/*6 + *4/*7 | 30,5 ± 16,2 | 114,1 ± 241,1 | 73,5 ± 95,6 | 27,8 ± 12,2 | 170,1 ± 320,3 |
| | *5/*5 + *5/*6 + *5/*7 + *6/*6 + *6/*7 | 46,9 ± 64,9 | 81,9 ± 85,9 | 45,1 ± 48,7 | 26,3 ± 6,1 | 207,5 ± 403,2 |
| | <i>p</i> | 0,633 | 0,633 | 0,349 | 0,344 | 0,771 |
| ALP (U/L) | *4/*4 | 92,5 ± 16,3 | 112,5 ± 41,7 | 104,8 ± 48,0 | 87,5 ± 7,8 | 75,3 ± 10,1 |
| | *4/*5 + *4/*6 + *4/*7 | 104,9 ± 17,1 | 237,8 ± 188,4 | 166,3 ± 129,4 | 91,0 ± 46,3 | 145,8 ± 227,1 |
| | *5/*5 + *5/*6 + *5/*7 + *6/*6 + *6/*7 | 124,8 ± 38,1 | 146,4 ± 105,9 | 153,0 ± 123,4 | 90,4 ± 26,3 | 26,3 ± 105,9 |
| | <i>p</i> | 0,136 | 0,481 | 0,659 | 0,741 | 0,284 |
| GGT (U/L) | *4/*4 | 49,5 ± 36,1 | 182,5 ± 38,9 | 33,8 ± 17,7 | 54,0 ± 19,8 | 477,0 ± 151,2 |
| | *4/*5 + *4/*6 + *4/*7 | 63,3 ± 50,4 | 188,4 ± 174,6 | 251,5 ± 221,7 | 63,5 ± 62,0 | 457,4 ± 477,9 |
| | *5/*5 + *5/*6 + *5/*7 + *6/*6 + *6/*7 | 61,9 ± 39,2 | 118,8 ± 122,7 | 92,0 ± 138,8 | 56,8 ± 56,8 | 188,3 ± 429,9 |
| | <i>p</i> | 0,844 | 0,381 | 0,252 | 0,827 | 0,172 |
| Bilirrubina direta (mg/dL) | *4/*4 | 0,3 ± 0,3 | 0,8 ± 0,6 | 0,4 ± 0,2 | 0,3 ± 0,2 | 76,7 ± 174,4 |
| | *4/*5 + *4/*6 + *4/*7 | 0,3 ± 0,2 | 1,8 ± 4,4 | 0,8 ± 1,4 | 0,3 ± 0,1 | 632,0 ± 463,5 |
| | *5/*5 + *5/*6 + *5/*7 + *6/*6 + *6/*7 | 0,3 ± 0,1 | 1,6 ± 2,6 | 0,7 ± 1,0 | 0,3 ± 0,1 | 481,5 ± 1191,4 |
| | <i>p</i> | 0,890 | 0,485 | 0,989 | 0,797 | 0,333 |
| Bilirrubina total (mg/dL) | *4/*4 | 1,1 ± 0,4 | 1,6 ± 0,7 | 0,9 ± 0,4 | 0,8 ± 0,1 | 16,45 ± 58,7 |
| | *4/*5 + *4/*6 + *4/*7 | 0,7 ± 0,4 | 3,2 ± 7,4 | 1,7 ± 2,2 | 0,9 ± 0,1 | 448,6 ± 367,9 |
| | *5/*5 + *5/*6 + *5/*7 + *6/*6 + *6/*7 | 0,7 ± 0,2 | 2,5 ± 3,6 | 1,2 ± 1,4 | 0,9 ± 0,5 | 272,9 ± 520,8 |
| | <i>p</i> | 0,312 | 0,114 | 0,701 | 0,066 | 0,316 |
| Creatinina (mg/dL) | *4/*4 | 0,9 ± 0,2 | 0,9 ± 0,2 | 0,8 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | 0,7 ± 0,3 |
| | *4/*5 + *4/*6 + *4/*7 | 0,8 ± 0,2 | 0,7 ± 0,2 | 0,9 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | -22,6 ± 28,1 |
| | *5/*5 + *5/*6 + *5/*7 + *6/*6 + *6/*7 | 0,8 ± 0,2 | 0,7 ± 0,1 | 1,3 ± 0,7 | 1,1 ± 0,4 | -6,6 ± 26,9 |
| | <i>p</i> | 0,712 | 0,056 | 0,743 | 0,103 | 0,529 |

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato amino transferase; ALP: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamil transferase. Valores apresentados como média ± desvio-padrão e comparados utilizando-se teste de análise de variância (ANOVA).

Nas Figuras 18 a 21 são apresentados os genótipos de acetilação *NAT2* [rápido (*NAT2**4/*4), intermediário (*NAT2**4/*5, *NAT2**4/*6 e *NAT2**4/*7) e lento (*NAT2**5/*5, *NAT2**5/*6, *NAT2**5/*7, *NAT2**6/*6 e *NAT2**6/*7)] e os resultados dos parâmetros bioquímicos basais no 2° mês de tratamento em pacientes com RAM. Nos pacientes portadores dos genótipos *NAT2**4/*5, *NAT2**4/*6 e *NAT2**4/*7 (acetiladores intermediários), foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) nos valores séricos de ALT e AST (Fig. 18), ALP e GGT (Fig. 19) e bilirrubinas (Fig. 20) no segundo mês de tratamento.

Esses resultados indicam que os indivíduos com RAM portadores dos genótipos intermediários apresentam alterações importantes no 2° mês de tratamento nos marcadores de lesão hepatocelular (ALT e AST) e colestase (bilirrubinas, ALP e GGT), sugerindo que o genótipo de acetilador intermediário é o principal fator de risco associado as alterações dos marcadores hepáticos.

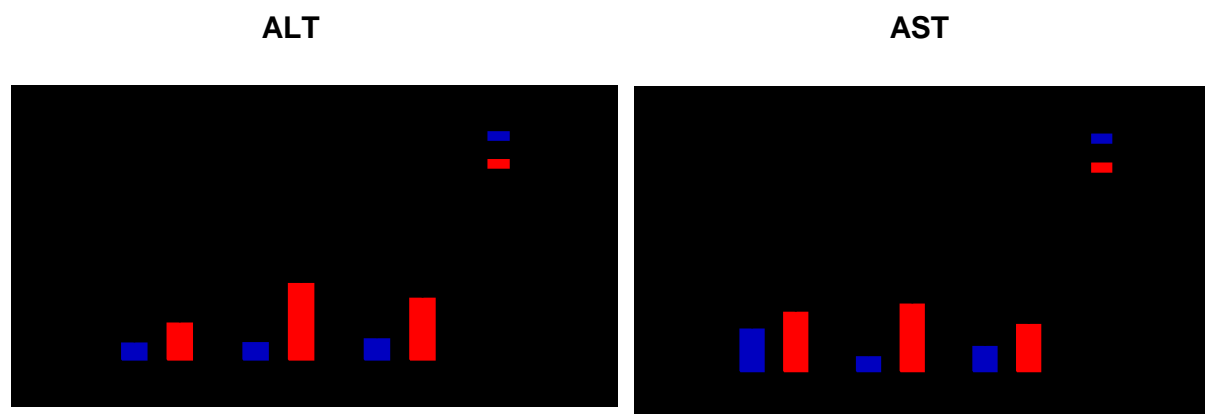


Figura 18. Valores ALT e AST durante o basal e o 2° mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação *NAT2*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student.

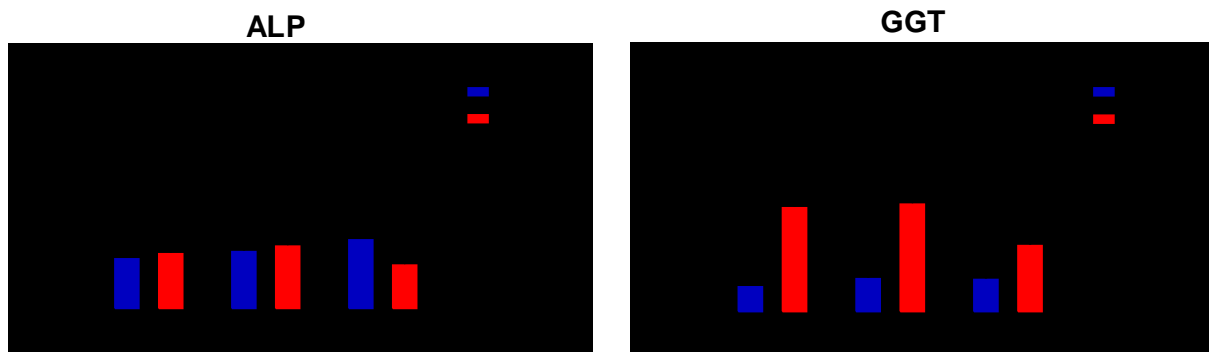


Figura 19. Valores ALP e GGT durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação *NAT2*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student.

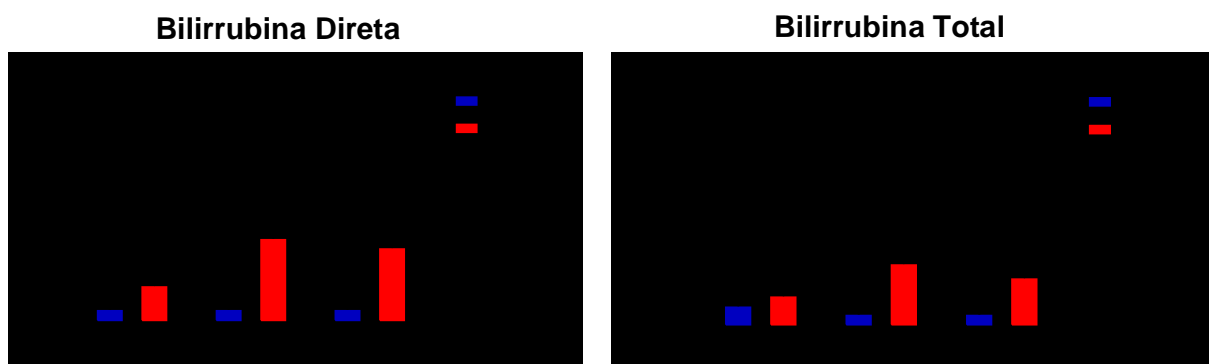


Figura 20. Valores de Bilirrubina direta e total durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação *NAT2*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student.

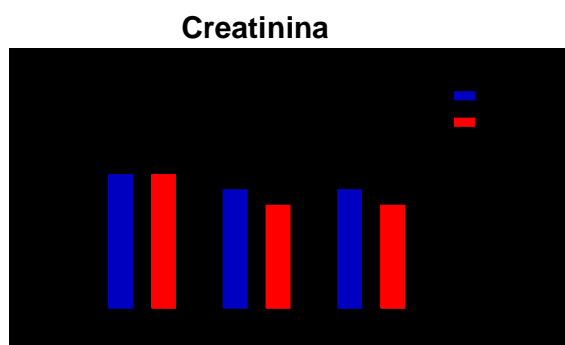


Figura 21. Valores creatinina durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos associados aos genótipos de acetilação *NAT2*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student.

As características biodemográficas e clínicas dos indivíduos com tuberculose foram comparadas entre os portadores dos diferentes genótipos de acetilação de NAT2 (Tabela 23). Não foi observada relação entre o perfil de acetilação e essas variáveis, sugerindo que a associação entre o perfil de acetilação e RAM e hepatotoxicidade é independente dessas variáveis.

Tabela 23. Relação entre genótipos de acetilação NAT2 e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose.

| Variável | Genótipo de acetilação NAT2 | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------------|
| | Lento (39) | Intermediário (45) | Rápido (15) | |
| Gênero | | | | |
| Masculino | 51,3% (20) | 55,6% (25) | 53,3% (8) | $\chi^2 = 0,154;$ $p = 0,926$ |
| Feminino | 48,7% (19) | 44,4% (20) | 46,7% (7) | |
| Idade | | | | |
| <50 anos | 76,9% (30) | 86,7 (39) | 93,3% (14) | $\chi^2 = 2,640;$ $p = 0,267$ |
| ≥ 50 anos | 23,1% (9) | 13,3 (6) | 6,7% (1) | |
| Etnia | | | | |
| Branco | 66,7 (26) | 64,4 (29) | 33,3 (5) | $\chi^2 = 5,551;$ $p = 0,062$ |
| Não Brancos | 33,3 (13) | 35,6 (16) | 66,7 (10) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim | 5,1% (2) | 8,9% (4) | 6,7% (1) | $\chi^2 = 0,454;$ $p = 0,797$ |
| Não | 94,9% (37) | 91,1% (41) | 93,3% (14) | |
| Medicação Concomitante | | | | |
| Não | 43,6% (17) | 46,7% (21) | 46,7% (7) | $\chi^2 = 0,090$ $p = 0,956;$ |
| Sim | 56,4% (22) | 53,3% (24) | 53,3% (8) | |
| Indutor NAT2 | 36,4% (8) | 20,8% (5) | 37,5% (3) | $\chi^2 = 4,307;$ $p = 0,828$ |
| Inibidor NAT2 | 36,4% (8) | 37,5% (9) | 37,5% (3) | |
| Indutor e Inibidor NAT2 | 18,2% (4) | 25,0% (6) | 0,0 (0) | |
| Sem efeito | 9,0% (2) | 16,7% (4) | 25,0% (2) | |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

4.3. Resultados do seqüenciamento de DNA

Foram realizadas reações de seqüenciamento do *NAT2* para os 99 indivíduos do grupo de estudo com a finalidade de confirmar os resultados de PCR-RFLP. Todos os resultados de genotipagem por PCR-RFLP para os SNPs *NAT2*5*, *NAT2*6* e *NAT2*7* foram confirmados pelo seqüenciamento do *NAT2*.

Na tabela 24, estão descritos outros polimorfismos do *NAT2*, identificados pelo seqüenciamento, assim como as respectivas trocas de nucleotídeos e de aminoácidos, tendo como base a seqüência de referência identificada como GI 11321494 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As variantes *NAT2*12A*, *NAT2*13* e *NAT2*5D* foram os polimorfismos identificados com maior freqüência, sendo as freqüências alélicas de 38,8%, 23,2% e 14,1%, respectivamente.

O grupo de estudo não apresentou diferença na distribuição dos alelos *NAT2*12A*, *NAT2*13* e *NAT2*5D* ($p= 0,199$) em relação as freqüências alélicas encontradas na população brasileira [*NAT2*12A* (64,5%), *NAT2*13* (31,3%) e *NAT2*5D* (34,6%)] (POSSUELO *et. al.*, 2008).

Dois novos polimorfismos foram identificamos, sendo eles a troca de um G por C na posição 548pb e a troca de um G por T na posição 724pb. O polimorfismo identificado na posição G⁵⁴⁸C não ocasiona em troca de aminoácido e assim nenhuma mudança da seqüência protéica é observada. Entretanto a alteração de G por T na posição 724pb cria um códon de parada, interrompendo a síntese protéica. Ainda foi identificada a inclusão de um C na posição 750pb para um dos indivíduos, o que ocasiona mudança de toda a seqüência de aminoácidos a partir dessa posição.

Tabela 24. Relação das variantes identificadas no *NAT2* por seqüenciamento de DNA, dos pacientes do grupo de estudo (n=99).

| Variantes | Troca de nucleotídeo | Troca de aminoácido | Freqüência % (n) |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| <i>NAT2</i> *5 <i>D</i> | T ³⁴¹ C | Ile ¹¹⁴ → Thr | 14,1 (28) |
| <i>NAT2</i> *12 <i>A</i> | A ⁸⁰³ G | Lys ²⁶⁸ → Arg | 38,8 (77) |
| <i>NAT2</i> *13 | C ²⁸² T | Nenhuma Troca | 23,2 (46) |
| <i>NAT2</i> *6 <i>D</i> ^a | T ¹¹¹ G | Nenhuma Troca | 0,5 (1) |
| <i>NAT2</i> *6 <i>H</i> ^a | A ⁷⁶⁶ G | Lys ²⁵⁶ → Glu | 1,0 (2) |
| <i>NAT2</i> *6 <i>I</i> ^a | G ⁸³⁸ A | Val ²⁸⁹ → Met | 1,0 (2) |
| - | G ⁵⁴⁸ C | Nenhuma Troca | 0,5 (1) |
| - | G ⁷²⁴ T | Arg ²⁴² → Códon de parada | 0,5 (1) |
| - | Inclusão "C" na posição 750pb | - | 0,5 (1) |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

^a Polimorfismo associado a uma variante do alelo *NAT2**6

Nas figuras 22A, B e C são mostradas as seqüências da fita reversa do seqüenciamento caracterizando as variantes *NAT2**5*D*, *NAT2**12 e *NAT2**13

representadas pela substituição de T para C na posição 341 pb, A para G na posição 803 pb e C para T na posição 282 pb, respectivamente.

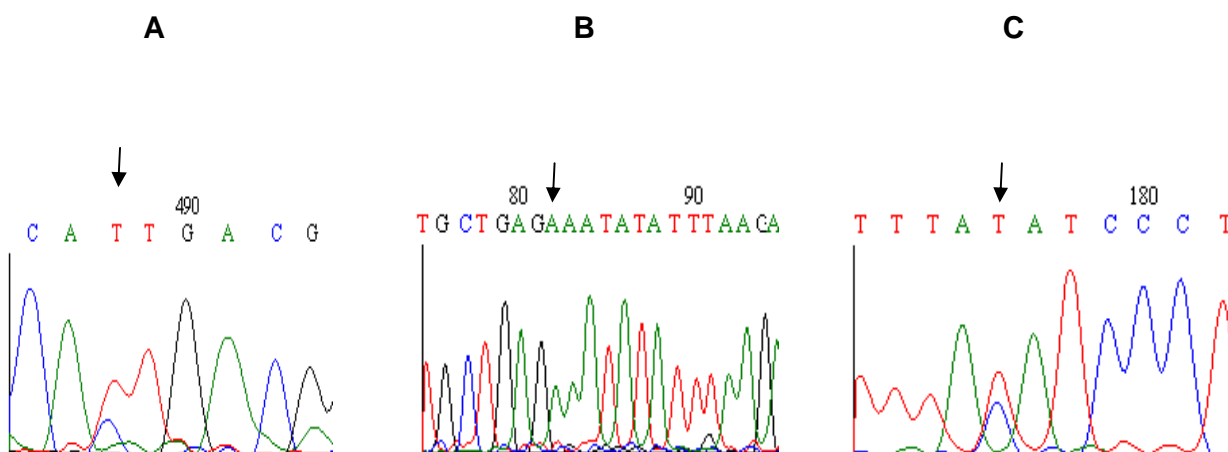


Figura 22. Eletroferograma representativo do seqüenciamento de DNA das variantes *NAT2*5D* (fita reversa, 341T>C) **(A)**; *NAT2*12* (fita reversa, 803A>G) **(B)**; e *NAT2*13* (fita reversa, 282C>T) **(C)**.

Nas figuras 23A, B e C são mostradas as seqüências da fita reversa do seqüenciamento caracterizando a inclusão de “C” na posição 750pb, a troca de G por C na posição 548pb e a G por T na posição 724pb.

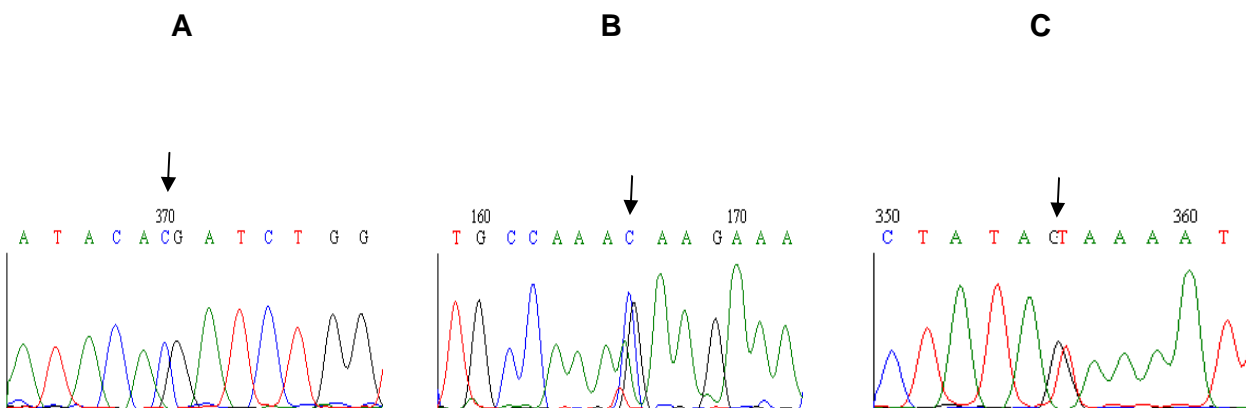


Figura 23. Eletroferograma representativo do seqüenciamento de DNA. **A:** Inclusão de “C” na posição 750pb. **B:** Ilustra a troca de G por C na posição 548pb. **C:** Ilustra a troca de G por T na posição 724pb.

Quando se analisa os alelos *NAT2*5D*, *NAT2*12* e *NAT2*13* entre os pacientes com e sem relato de RAM e hepatotoxicidade, não se observa diferença significativa entre os grupos com RAM e sem RAM e com o diagnóstico de hepatotoxicidade, porém os alelos *NAT2*12* e *NAT2*13*, que caracterizam um acetilador rápido são mais freqüentes no grupo sem relato de RAM, o que mostra um provável efeito protetor. Por outro lado, o alelo *NAT2*5D* que caracteriza um acetilador lento é mais freqüente (58,3%) no grupo com RAM quando comparado com o grupo sem RAM (20,6%) (Tabela 25).

Tabela 25. Distribuição das freqüências alélicas dos SNPs *NAT2*5D*, *NAT2*12* e *NAT2*13* em pacientes com tuberculose que relataram ou não reações adversas a medicamentos (RAM) e em pacientes com e sem hepatotoxicidade.

| Alelos | RAM | | | Hepatotoxicidade | | |
|----------------|-------------|-------------|---------------------------------|------------------|-------------|---------------------------------|
| | Não (n= 40) | Sim (n= 59) | | Não (n= 88) | Sim (n= 11) | |
| <i>NAT2*5D</i> | 58,3% (21) | 20,6% (7) | P= 1,000 | 14,2% (25) | 13,6% (3) | $\chi^2 = 0,064/$ $p= 0,801$ |
| <i>NAT2*12</i> | 80,3% (45) | 88,9% (32) | $\chi^2 = 1,452/$ $p= 0,228$ | 39,8% (70) | 31,8% (7) | $\chi^2 = 0,240/$ $p= 0,624$ |
| <i>NAT2*13</i> | 78,1% (25) | 80,8% (21) | $\chi^2 = 0,042/$ $p= 0,837$ | 22,7% (40) | 27,3% (6) | $\chi^2 = 0,043/$ $p= 0,835$ |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

4.4. Resultados dos polimorfismos *CYP2E1*

Na tabela 26 são observadas a distribuição de genótipos e a freqüência de alelos das variantes do *CYP2E1*. Os genótipos mais freqüentes foram o **1A/*1A* (83,9%) e o **1B/*5B* (12,1%). Os genótipos **1A/*5B* (3,0%) e **1A/*1B* (1,0%) foram os menos freqüentes, respectivamente.

O alelo mais freqüente foi o *CYP2E1*1A* (85,8%) e os menos freqüentes foram *CYP2E1*1B* (6,6%) e *CYP2E1*5B* (7,6%). O grupo de estudo não apresentou diferença na distribuição dos alelos (valor $p= 0,165$) em relação as freqüências alélicas na população brasileira descritas por ROSSINI e colaboradores (2006).

Os resultados da análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) avaliada pelo teste de qui-quadrado, indicam que a distribuição para os genótipos *CYP2E1*1B* e *CYP2E1*5B*, estão em HWE nesta amostra populacional ($p > 0,05$). Logo, o número de genótipos observados obedece à distribuição esperada para uma população em condições de equilíbrio. Por outro lado, desequilíbrio de ligação foi encontrado entre os polimorfismos *CYP2E1*1B* e *CYP2E1*5B* ($D' = 1.00$).

Tabela 26. Distribuição de genótipos e frequência de alelos das variantes *CYP2E1*.

| Distribuição dos Genótipos | | Alelos <i>CYP2E1</i> | Frequência nos indivíduos estudados | Frequência na população brasileira |
|----------------------------|-----------|-------------------------|---|--|
| <i>*1A/*1A</i> | 83,9 (83) | <i>*1A</i> | 85,8 (170) | 95,0 (549) |
| <i>*1A/*1B</i> | 1,0 (1) | <i>*1B</i> | 6,6 (13) | ND |
| <i>*1A/*5B</i> | 3,0 (3) | <i>*5B</i> | 7,6 (15) | 5,0 (29) |
| <i>*1B/*5B</i> | 12,1 (12) | | $p = 0,165$ | |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

Frequência de alelos na população brasileira - ROSSINI *et al.*, 2006.

ND: Dado não disponível.

Equilíbrio Hardy-Weinberg (ZOU *et al.*, 2006):

*CYP2E1*1B* SNP: $\chi^2 = 0.5748$ (1gl, $p > 0,05$);

*CYP2E1*5B* SNP: $\chi^2 = 0.5574$ (1gl, $p > 0,05$).

Para a análise da relação das variantes *CYP2E1* com RAM e hepatotoxicidade, os indivíduos com variantes **1A/*1B*, **1A/*5* e **1B/*1B* foram reunidos em um único grupo e comparados com o genótipo comum **1A/*1A*.

Quando se analisa os polimorfismos do *CYP2E1* nos pacientes com tuberculose apresentando RAM ou hepatotoxicidade, não encontramos diferenças nas freqüências dos genótipos variantes (**1A/*1B*, **1A/*5* e **1B/*1B*) entre indivíduos com RAM ($p= 0,091$) e hepatotoxicidade ($p= 0,687$), quando comparados com os indivíduos sem RAM ou hepatotoxicidade respectivamente (Tabela 27). Esses resultados são sugestivos de que a manifestação de RAM e de hepatotoxicidade não está relacionada com variantes do *CYP2E1*.

Tabela 27. Freqüências de genótipos de variantes do *CYP2E1* em pacientes com tuberculose, de acordo com a presença de RAM ou hepatotoxicidade.

| Genótipos | RAM | | Hepatotoxicidade | |
|----------------|-----------------------------|-------------|------------------|-------------|
| | Não (n= 40) | Sim (n= 59) | Não (n= 88) | Sim (n= 11) |
| <i>*1A/*1A</i> | 75,0 (30) | 89,8 (53) | 82,9 (73) | 90,9 (10) |
| <i>*1A/*1B</i> | | | | |
| <i>*1A/*5B</i> | 25,0 (10) | 10,2 (6) | 17,0 (15) | 9,1 (1) |
| <i>*1B/*5B</i> | | | | |
| | $\chi^2 = 2,852 / p= 0,091$ | | P= 0,687 | |

Número de indivíduos entre parênteses.

Na tabela 28, são apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento com antimicobacterianos e a variação em porcentagem do 2º mês de tratamento com o período basal, dos indivíduos portadores dos genótipos *CYP2E1* **1A/*1A* e variantes (**1A/*1B* + **1A/*5B* + **1B/*5B*).

No período basal e nos meses subsequentes de tratamento (2, 4 e 6 meses), os valores médios dos parâmetros bioquímicos analisados e os valores de alteração foram similares ($p > 0,05$) para todos os parâmetros analisados, entre os grupos *CYP2E1*1A/*1A* e *CYP2E1*1A/*1B + CYP2E1*1A/*5B + CYP2E1*1B/*5B*.

Tabela 28. Dados de perfil bioquímico antes e após o tratamento com antimicobacterianos dos indivíduos portadores dos genótipos *CYP2E1*.

| Variável | <i>CYP2E1</i> | Basal | Tempo de tratamento | | | % alteração Basal vs 2 meses |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|
| | | | 2 meses | 4 meses | 6 meses | |
| ALT (U/L) | *1A/*1A | 40,1 ± 25,9 | 131,6 ± 267,4 | 57,2 ± 74,5 | 28,9 ± 14,7 | 124,5 ± 270,3 |
| | **1A /*1B + *1A /*5B + *1B/*5B | 30,0 ± 10,7 | 34,0 ± 6,8 | 33,0 ± 4,2 | 31,0 ± 7,7 | 0,8 ± 11,1 |
| | <i>p</i> | 0,461 ^b | 0,063 ^b | 0,972 ^b | 0,367 ^b | 0,316 |
| AST (U/L) | *1A/*1A | 40,6 ± 49,1 | 109,8 ± 179,1 | 57,9 ± 76,7 | 26,4 ± 9,2 | 201,4 ± 364,6 |
| | **1A /*1B + *1A /*5B + *1B/*5B | 31,6 ± 9,7 | 28,8 ± 10,8 | 58,0 ± 35,4 | 25,1 ± 1,8 | 11,8 ± 75,9 |
| | <i>p</i> | 0,500 ^b | 0,060 ^b | 0,414 ^b | 0,956 ^b | 0,168 |
| ALP (U/L) | *1A/*1A | 111,7 ± 31,8 | 187,9 ± 159,4 | 134,8 ± 108,4 | 90,8 ± 40,2 | 69,6 ± 113,9 |
| | **1A /*1B + *1A /*5B + *1B/*5B | 118,6 ± 20,2 | 190,5 ± 154,6 | 231,0 ± 80,6 | 69,5 ± 15,8 | 22,5 ± 99,7 |
| | <i>p</i> | 0,650 ^a | 0,364 ^b | 0,106 ^b | 0,226 ^a | 0,156 |
| GGT (U/L) | *1A/*1A | 90,5 ± 150,8 | 176,3 ± 148,6 | 124,3 ± 139,1 | 60,7 ± 58,3 | 256,6 ± 304,9 |
| | **1A /*1B + *1A /*5B + *1B/*5B | 60,0 ± 55,0 | 87,8 ± 115,6 | 393,5 ± 514,1 | 41,6 ± 24,5 | 9,4 ± 13,3 |
| | <i>p</i> | 0,697 ^b | 0,100 ^b | 0,530 ^b | 0,750 ^b | 0,050 |
| Bilirrubina direta (mg/dL) | *1A/*1A | 0,3 ± 0,3 | 1,8 ± 3,6 | 0,7 ± 1,1 | 0,3 ± 0,1 | 315,9 ± 643,1 |
| | **1A /*1B + *1A /*5B + *1B/*5B | 0,3 ± 0,2 | 0,4 ± 0,3 | 0,3 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 | 110,0 ± 79,4 |
| | <i>p</i> | 0,246 ^b | 0,547 ^b | 0,782 ^b | 0,165 ^b | 0,462 |
| Bilirrubina total (mg/dL) | *1A/*1A | 0,7 ± 0,5 | 3,1 ± 5,7 | 1,3 ± 1,7 | 0,9 ± 0,4 | 230,7 ± 553,8 |
| | **1A /*1B + *1A /*5B + *1B/*5B | 0,9 ± 0,6 | 1,0 ± 0,5 | 1,3 ± 0,4 | 0,9 ± 0,1 | 126,7 ± 110,1 |
| | <i>p</i> | 0,194 ^b | 0,754 ^b | 0,297 ^b | 0,376 ^b | 0,537 |
| Creatinina (mg/dL) | *1A/*1A | 0,8 ± 0,2 | 0,7 ± 0,1 | 1,0 ± 0,4 | 0,9 ± 0,3 | -32,8 ± 18,9 |
| | **1A /*1B + *1A /*5B + *1B/*5B | 0,7 ± 0,3 | 0,7 ± 0,2 | 1,0 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | 22,5 ± 67,2 |
| | <i>p</i> | 0,609 ^b | 0,278 ^a | 0,349 ^b | 0,968 ^b | 0,119 |

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato amino transferase; ALP: fosfatase alcalina; GTT: gama-glutamil transferase.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão e comparados utilizando-se teste t- student^(a) ou Mann Whitney Rank Sum Test^(b).

Nas Figuras 24 a 27 são apresentadas as variantes do *CYP2E1* e os resultados dos parâmetros bioquímicos basais e no 2º mês de tratamento em pacientes com RAM. Nos pacientes não portadores dos alelos *CYP2E1*5* e *CYP2E1*1B*, foram observados aumentos significativos nos valores séricos de ALT e AST (Fig. 24), ALP e GGT (Fig. 25) e bilirrubinas (Fig. 26) no segundo mês de tratamento.

Esses resultados indicam que os indivíduos com RAM não portadores dos alelos *CYP2E1*5* e *CYP2E1*1B* apresentam alterações importantes no 2º mês de tratamento nos marcadores de lesão hepatocelular (ALT e AST) e colestase (bilirrubinas, ALP e GGT), sugerindo que a alelo *CYP2E1*1A* é principal fator de risco associado as alterações dos marcadores hepáticos.

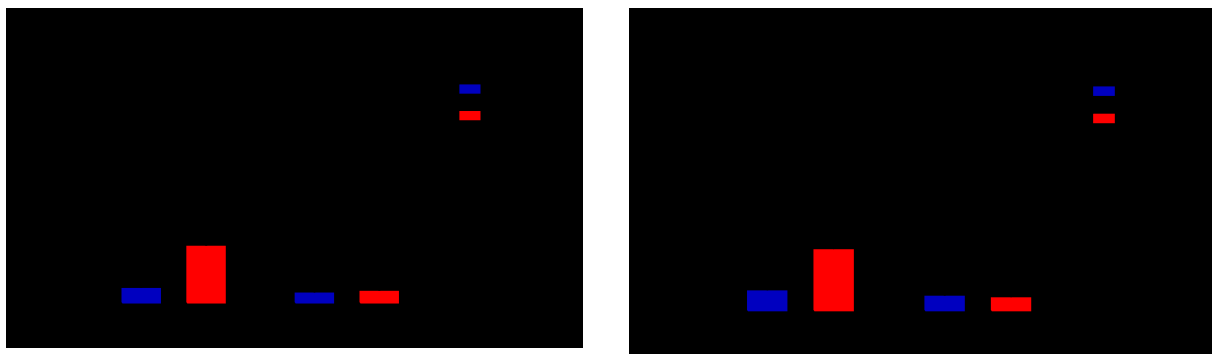


Figura 24. Comparação dos valores de ALT e AST durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *CYP2E1*. Resultados comparados pelo teste t de Student

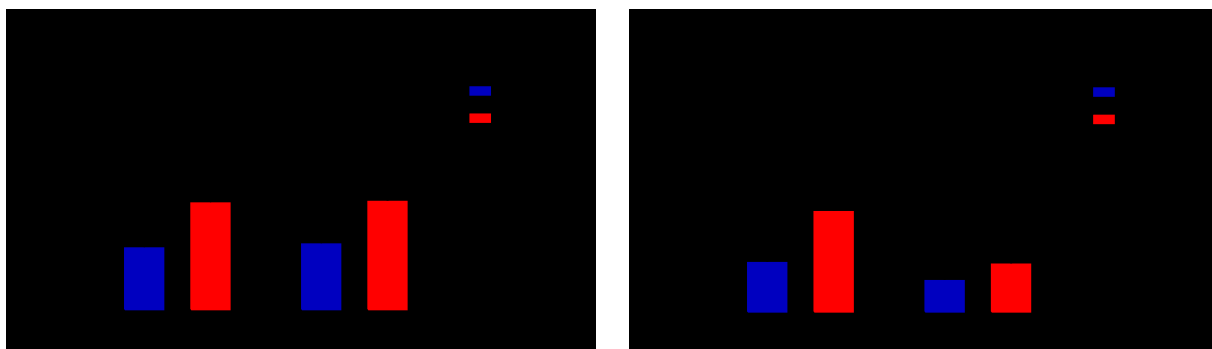


Figura 25. Comparação dos valores de ALP e GGT durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *CYP2E1*. Resultados comparados pelo teste t de Student

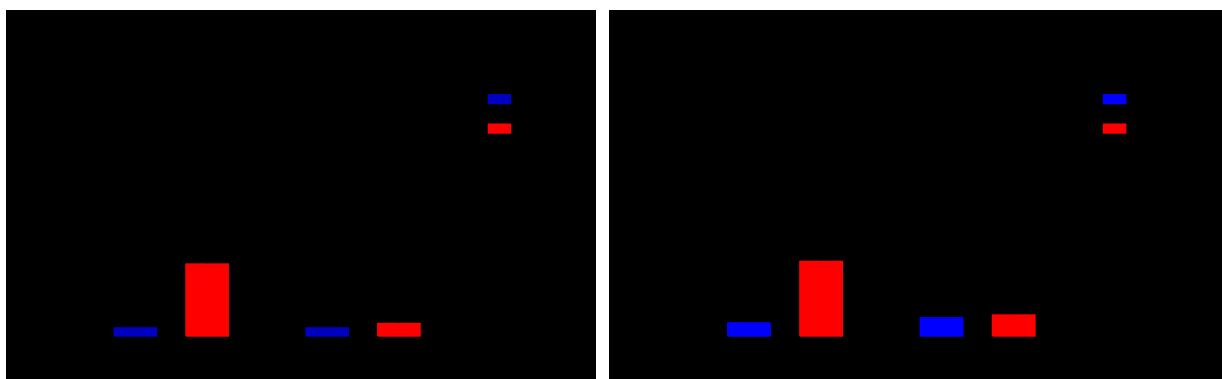


Figura 26. Comparação dos valores de Bilirrubinas (direta e total) durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *CYP2E1*. Resultados comparados pelo teste t de Student.

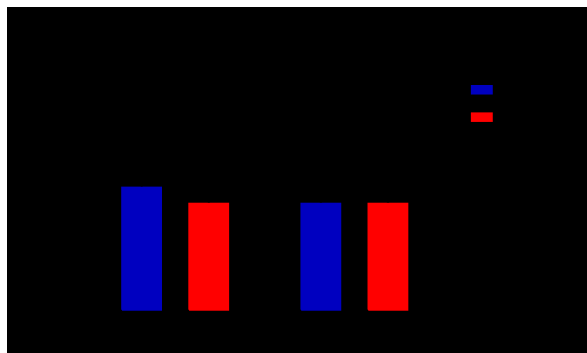


Figura 27. Comparação dos valores de creatinina durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *CYP2E1*. Resultados comparados pelo teste t de Student

As características biodemográficas e clínicas dos indivíduos com tuberculose foram comparadas entre os portadores dos genótipos *CYP2E1* (Tabela 29). Não foi observada relação entre os genótipos raros *CYP2E1* e essas variáveis, com exceção do uso de medicação concomitante que foi maior nos indivíduos portadores do genótipo comum *1A/*1A (60,2%) do que nos portadores dos genótipos variantes (25,0%, $p= 0,020$). Entretanto, esse resultado tem que ser analisado com precaução porque o número de portadores dos genótipos raros *CYP2E1* é muito pequeno.

Tabela 29. Relação entre genótipos *CYP2E1* e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose.

| Variável | Genótipos <i>CYP2E1</i> | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| | *1A/*1A (83) | *1A/*1B + *1A/*5B + *1B/*5B (16) | |
| Gênero | | | |
| Masculino | 50,6% (42) | 68,8% (11) | $\chi^2 = 1,121;$ $p = 0,290$ |
| Feminino | 49,4% (41) | 31,2% (5) | |
| Idade | | | |
| <50 anos | 83,1% (69) | 75,0% (12) | P = 0,482 |
| ≥50 anos | 16,9% (14) | 25,0% (4) | |
| Etnia | | | |
| Branco | 60,2% (50) | 68,8% (11) | $\chi^2 = 0,130;$ $p = 0,719$ |
| Não Brancos | 39,8% (33) | 31,2% (5) | |
| Etilismo | | | |
| Sim | 7,2% (6) | 6,2% (1) | P = 1,000 |
| Não | 92,8% (77) | 93,8% (15) | |
| Medicação Concomitante | | | |
| Não | 39,8% (33) | 75,0% (12) | $\chi^2 = 5,373;$ $p = 0,020$ |
| Sim | 60,2% (50) | 25,0% (4) | |
| Indutor | 25,9 (14) | 3,7 (2) | $\chi^2 = 1,512;$ $p = 0,680$ |
| Inibidor | 35,1 (19) | 1,9 (1) | |
| Indutor e Inibidor | 16,7 (9) | 1,9 (1) | |
| Sem efeito | 14,8 (8) | 0,0 (0) | |

Número de indivíduos entre parênteses.

4.5. Análise dos polimorfismos GST

Na tabela 30 são observadas as freqüências genótípicas e das variantes do *GSTM1* e *GSTT1*. Os genótipos mais freqüentes foram o *GSTM1*1/GSTT1*1* (44,4%) e o *GSTT1*1/GSTM1*0* (37,4%). Os genótipos *GSTM1*1/GSTT1*0* e *GSTM1*0/GSTT1*0*, foram os menos freqüentes (9,1%).

Os alelos mais freqüentes foram o *GSTT1*1* (40,9%) e o *GSTM1*1* (26,8%) e o menos freqüente foi o *GSTT1*0* (9,1 %). As freqüências alélicas dos indivíduos deste estudo foram similares as de outro estudo da população brasileira (Tabela 30) (ROSSINI *et al.*, 2002).

Tabela 30. Freqüências de genótipos e alélicas das variantes *GSTM1* e *GSTT1*

| Distribuição dos Genótipos | Alelos GST | Freqüência nos indivíduos estudados | Freqüência na população brasileira |
|----------------------------------|----------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| <i>GSTM1*1/GSTT1*1</i> 44,4 (44) | <i>GSTM1*1</i> | 26,8 (53) | 22,7 (134) |
| <i>GSTT1*1/GSTM1*0</i> 37,4 (37) | <i>GSTT1*1</i> | 40,9 (81) | 42,1 (249) |
| <i>GSTM1*1/GSTT1*0</i> 9,1 (9) | <i>GSTM1*0</i> | 23,2 (46) | 25,4 (150) |
| <i>GSTM1*0/GSTT1*0</i> 9,1 (9) | <i>GSTT1*0</i> | 9,1 (18) | 9,8 (58) |

$\chi^2 = 1,458; p = 0,692$

Número de indivíduos entre parênteses.

Freqüência de alelos na população brasileira ROSSINI *et al.*, 2002

Na tabela 31, estão descritos os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* nos pacientes com tuberculose que apresentaram ou não RAM e hepatotoxicidade. Os indivíduos portadores de pelo menos um alelo nulo *GSTM1*0* e *GSTT1*0* foram agrupados e comparados com os portadores dos genótipos funcionais *GSTM1*1/GSTT1*1*. Não foram observadas diferenças de freqüências dos genótipos nulos *GSTM1*0* e *GSTT1*0* entre indivíduos com (52,6%) e sem RAM (60,0%, $p=0,598$). Perfil similar também foi observado para a presença de hepatotoxicidade ($p=0,209$). Esses resultados são sugestivos de que as variantes GST não estão associadas com a manifestação de RAM ou a presença de hepatotoxicidade.

Tabela 31. Freqüências de genótipos de variantes do GST em pacientes que relataram ou não reações adversas a medicamentos (RAM) e em pacientes com e sem hepatotoxicidade.

| Genótipos | RAM | | Hepatotoxicidade | |
|-------------------------|----------------------------|-------------|------------------|-------------|
| | Não (n= 40) | Sim (n= 59) | Não (n= 88) | Sim (n= 11) |
| <i>GSTM1*1/GSTT1*1</i> | 40,0 (16) | 47,4 (28) | 42,0 (37) | 63,6% (7) |
| <i>GSTT1*1/GSTM1*0</i> | | | | |
| <i>GSTM1*1/GSTT1*0</i> | 60,0 (24) | 52,6 (31) | 58,0 (51) | 36,4% (4) |
| <i>GSTM1*0/ GSTT1*0</i> | | | | |
| | $\chi^2 = 0,277, p= 0,598$ | | P= 0,209 | |

Número de indivíduos entre parênteses.

Na tabela 32, são apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos, antes e após o tratamento com antimicobacterianos e a variação em porcentagem do 2º mês de tratamento com o período basal, dos indivíduos portadores do genótipo funcional *GSTM1*1/GSTT1*1* e de pelo menos um genótipo nulo *GSTT1*1/GSTM1*0*, *GSTM1*1/GSTT1*0* e *GSTM1*0/GSTT1*0*.

No 2º mês de tratamento, os valores médios de ALT ($146,7 \pm 235,6$ U/L) e ALP ($206,4 \pm 132,2$ U/L) foram maiores nos indivíduos portadores do genótipo funcional *GSTM1*1/GSTT1*1* quando comparados com os indivíduos portadores dos genótipos nulos (ALT: $60,8 \pm 77,7$ U/L, $p= 0,007$; ALP: $67,9 \pm 161,7$ U/L, $p= 0,015$) (Tabela 32). Para AST também foi observado perfil similar, mas não significativo quando se avaliaram os dados individuais ($p= 0,084$). Entretanto, ao analisar a porcentagem de variação entre o basal e o 2º mês de tratamento, foi observada maior porcentagem de variação para os portadores do genótipo funcional que para os portadores do genótipo nulo ($p= 0,043$).

Esses resultados são sugestivos de que o genótipo *GSTM1*1/GSTT1*1* está relacionado com alterações mais acentuadas no perfil de ALT, AST e ALP séricas, indicando associação com a lesão hepatocelular e colestase.

Tabela 32. Dados de perfil bioquímico de indivíduos com tuberculose, antes e após o tratamento farmacológico, agrupados por genótipos *GST*.

| Variável | <i>GST</i> | Basal | Tempo de tratamento | | | % alteração Basal vs 2 meses |
|----------------------------|------------------|---------------|---------------------|---------------|--------------|------------------------------|
| | | | 2 meses | 4 meses | 6 meses | |
| ALT (U/L) | GSTM1*1/GSTT1*1 | 45,3 ± 60,9 | 146,7 ± 235,6 | 57,9 ± 74,7 | 27,8 ± 11,5 | 181,2 ± 364,7 |
| | GSTT1*1/GSTM1*0 | | | | | |
| | GSTM1*1/GSTT1*0 | 32,4 ± 15,2 | 60,8 ± 77,7 | 44,2 ± 45,2 | 25,6 ± 7,7 | 12,3 ± 108,8 |
| | GSTM1*0/ GSTT1*0 | | | | | |
| | <i>p</i> | 0,840 | 0,007 | 0,707 | 0,545 | 0,029 |
| AST (U/L) | GSTM1*1/GSTT1*1 | 36,0 ± 20,8 | 184,6 ± 365,2 | 75,1 ± 100,9 | 34,2 ± 20,7 | 222,9 ± 287,3 |
| | GSTT1*1/GSTM1*0 | | | | | |
| | GSTM1*1/GSTT1*0 | 40,4 ± 27,1 | 66,5 ± 80,3 | 41,4 ± 37,3 | 25,8 ± 8,7 | 86,8 ± 223,3 |
| | GSTM1*0/ GSTT1*0 | | | | | |
| | <i>p</i> | 0,659 | 0,084 | 0,571 | 0,121 | 0,043 |
| ALP (U/L) | GSTM1*1/GSTT1*1 | 118,0 ± 35,1 | 206,4 ± 132,2 | 127,7 ± 70,7 | 79,1 ± 20,1 | 114,2 ± 147,6 |
| | GSTT1*1/GSTM1*0 | | | | | |
| | GSTM1*1/GSTT1*0 | 108,8 ± 25,4 | 67,9 ± 161,7 | 159,7 ± 133,3 | 102,5 ± 52,4 | 67,9 ± 161,7 |
| | GSTM1*0/ GSTT1*0 | | | | | |
| | <i>p</i> | 0,421 | 0,015 | 0,894 | 0,258 | 0,280 |
| GGT (U/L) | GSTM1*1/GSTT1*1 | 116,0 ± 199,5 | 126,3 ± 84,7 | 188,4 ± 245,3 | 50,8 ± 50,9 | 328,5 ± 346,4 |
| | GSTT1*1/GSTM1*0 | | | | | |
| | GSTM1*1/GSTT1*0 | 58,7 ± 36,5 | 170,2 ± 165,8 | 121,3 ± 146,7 | 69,6 ± 65,7 | 437,2 ± 778,7 |
| | GSTM1*0/ GSTT1*0 | | | | | |
| | <i>p</i> | 0,787 | 0,519 | 0,789 | 0,414 | 0,698 |
| Bilirrubina direta (mg/dL) | GSTM1*1/GSTT1*1 | 0,3 ± 0,3 | 1,9 ± 4,6 | 0,8 ± 1,4 | 0,3 ± 0,1 | 863,0 ± 298,6 |
| | GSTT1*1/GSTM1*0 | | | | | |
| | GSTM1*1/GSTT1*0 | 0,3 ± 0,2 | 1,3 ± 2,3 | 0,6 ± 0,8 | 0,3 ± 0,2 | 550,1 ± 176,1 |
| | GSTM1*0/ GSTT1*0 | | | | | |
| | <i>p</i> | 0,613 | 0,879 | 0,848 | 0,407 | 0,266 |
| Bilirrubina total (mg/dL) | GSTM1*1/GSTT1*1 | 0,8 ± 0,7 | 3,5 ± 7,7 | 1,7 ± 2,3 | 0,9 ± 0,1 | 401,7 ± 942,8 |
| | GSTT1*1/GSTM1*0 | | | | | |
| | GSTM1*1/GSTT1*0 | 0,7 ± 0,4 | 2,2 ± 3,1 | 1,1 ± 1,1 | 0,9 ± 0,5 | 231,9 ± 530,0 |
| | GSTM1*0/ GSTT1*0 | | | | | |
| | <i>p</i> | 0,702 | 0,860 | 0,547 | 0,584 | 0,167 |
| Creatinina (mg/dL) | GSTM1*1/GSTT1*1 | 0,8 ± 0,2 | 0,8 ± 0,1 | 0,9 ± 1,0 | 0,9 ± 0,1 | 10,9 ± 16,3 |
| | GSTT1*1/GSTM1*0 | | | | | |
| | GSTM1*1/GSTT1*0 | 0,8 ± 0,2 | 0,7 ± 0,1 | 1,0 ± 0,5 | 0,9 ± 0,4 | -5,6 ± 48,4 |
| | GSTM1*0/ GSTT1*0 | | | | | |
| | <i>p</i> | 0,867 | 0,065 | 0,272 | 0,312 | 0,897 |

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato amino transferase; ALP: fosfatase alcalina; GTT: gama-glutamil transferase. Valores apresentados como média ± desvio-padrão e comparados utilizando-se teste de análise de variância (ANOVA).

(a) $p < 0,05$ entre os valores médios dos genótipos GSTM1*1/GSTT1*1 e GSTM1*0/ GSTT1*0

Nas Figuras 28 a 31 são apresentados as variantes do *GST* e os resultados dos parâmetros bioquímicos basais e no 2º mês de tratamento em pacientes com RAM. Nos pacientes portadores dos genótipos *GSTM1*1* e *GSTT1*1*, foram observados aumentos significativos nos valores séricos de ALT e AST (Fig. 28) no segundo mês de tratamento ($p < 0,001$ e $p = 0,002$ respectivamente). Ainda observamos que os indivíduos portadores de pelo menos um genótipo nulo (*GSTM1*0* e/ou *GSTT1*0*) apresentaram maiores níveis médios de GGT no 2º mês de tratamento.

Esses resultados são sugestivos de que o genótipo *GSTM1*1/GSTT1*1* está relacionado com alterações mais acentuadas no perfil de ALT e AST nos indivíduos com RAM, indicando associação com hepatotoxicidade, entretanto a presença do genótipo nulo deve ser observada como fator de risco para o desenvolvimento de colestase (elevações dos níveis médios de GGT).

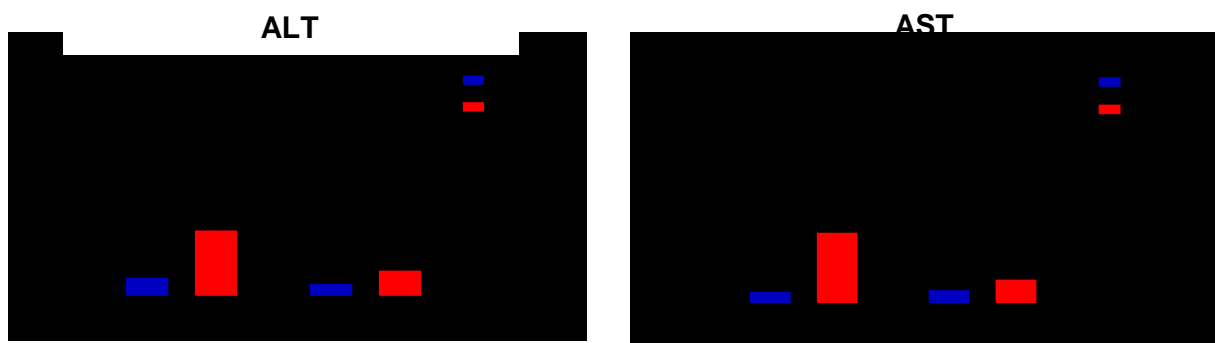


Figura 28. Comparação dos valores de ALT e AST durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *GST*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student

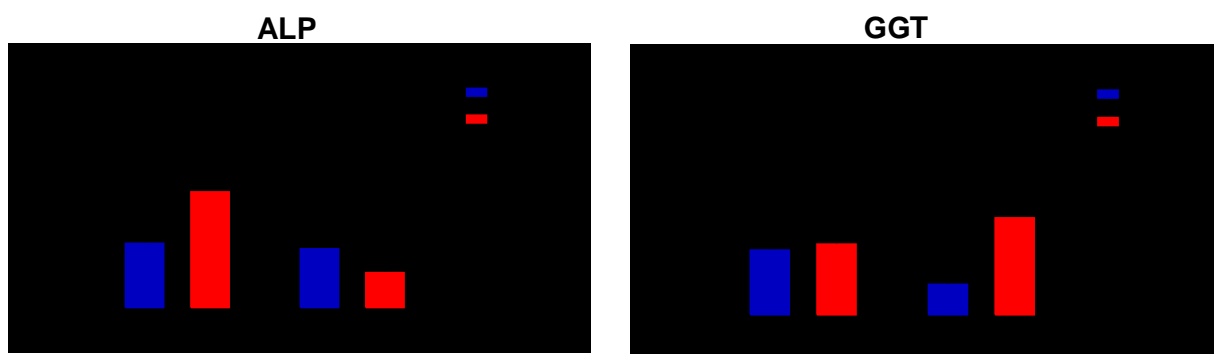


Figura 29. Comparação dos valores de ALP e GGT durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicrobianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *GST*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student

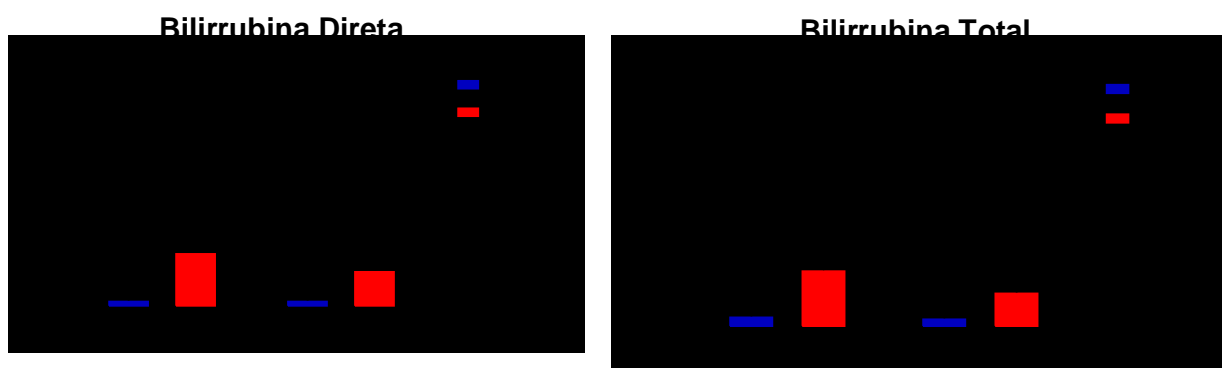


Figura 30. Comparação dos valores de bilirrubinas (direta e total) durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicrobianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *GST*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student

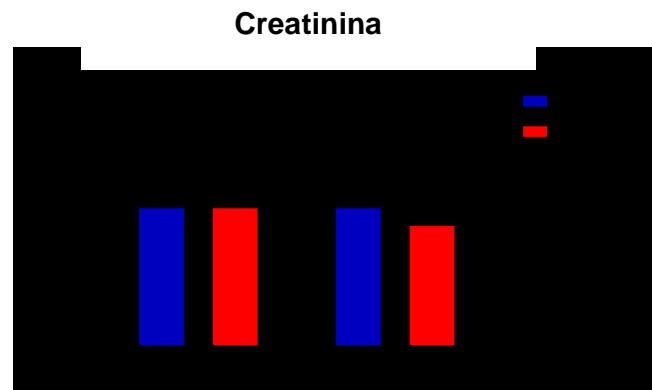


Figura 31. Comparação dos valores de creatinina durante o basal e o 2º mês de tratamento com antimicobacterianos em indivíduos com RAM, associados às variantes *GST*. Resultados comparados pelo teste *t* de Student

As características biodemográficas e clínicas dos indivíduos com tuberculose foram comparadas entre os portadores dos genótipos *GST* (Tabela 33). Não foi observada relação entre essas variáveis e os genótipos nulos ($GSTM1^*0 + GSTT1^*0$), sugerindo que essas variáveis não influenciam na relação entre os genótipos *GST* funcionais ($GSTM1^*1/GSTT1^*1$) com o perfil de hepatotoxicidade ou RAM.

Tabela 33. Relação entre variantes *GSTM1* e *GSTT1* e parâmetros biodemográficos e clínicos dos indivíduos com tuberculose

| Variável | Genótipos GST | | |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| | <i>GSTM1*1/GSTT1*1</i> (44) | <i>GSTM1*0 + GSTT1*0</i> (55) | |
| Gênero | | | |
| Masculino | 54,5% (24) | 52,8% (29) | $\chi^2 < 0,001$; |
| Feminino | 45,5% (20) | 47,2% (26) | $p = 0,982$ |
| Idade | | | |
| <50 anos | 88,6% (39) | 80,0% (44) | $\chi^2 = 1,128$; |
| ≥50 anos | 11,4% (5) | 20,0% (12) | $p = 0,288$ |
| Etnia | | | |
| Branços | 54,5% (24) | 65,5% (36) | $\chi^2 = 0,804$; |
| Não Brancos | 45,5% (20) | 34,5% (19) | $p = 0,370$ |
| Etilismo | | | |
| Sim | 6,8% (3) | 7,3% (4) | $P = 1,000$ |
| Não | 93,2% (41) | 92,7% (51) | |
| Medicação Concomitante | | | |
| Não | 40,9% (18) | 49,1% (27) | $\chi^2 = 0,371$; |
| Sim | 59,1% (26) | 50,9% (28) | $p = 0,542$ |
| Indutor | 14,8 (8) | 14,8 (8) | $\chi^2 = 4,232$; |
| Inibidor | 20,4 (11) | 16,7 (9) | |
| Indutor e Inibidor | 3,7 (2) | 14,8 (8) | |
| Sem efeito | 9,3 (5) | 5,5 (3) | |

Número de indivíduos entre parênteses.

4.6 Resultados da Análise de Regressão Logística

As variantes do *NAT2*, *CYP2E1* e *GST* foram testadas no modelo binário de regressão logística para estimar a probabilidade de um indivíduo apresentar RAM.

As variáveis usadas foram:

- 1) Genótipos *NAT2* (*4*4, *4*5, *4*6, *4*7, *5*5, *5*6, *5*7, *6*6 e *6*7)
- 2) Genótipos *CYP2E1* (*1A/*1A, *1A/*5B e *1A/*1B)

3) Genótipos GST (*GSTT1*1/GSTM1*1*, *GSTT1*1/GSTM1*0*, *GSTM1*1/GSTT1*0*, *GSTM1*0/GSTT1*0*)

Como se pode observar na tabela 34, ao se adotar $p=0,05$ a chance de um indivíduo apresentar reações adversas é 2,3 vezes maior na presença do genótipo *NAT2*4*5* que os portadores do genótipo funcional *NAT2*4*4* ($p=0,040$). Enquanto que os portadores do genótipo *NAT2*5*5* apresentam risco ainda maior (OD: 5,0 IC: 1,096 - 22,820, $p=0,038$). Os outros genótipos *NAT2* não foram associados com risco de RAM.

Uma segunda análise foi realizada, ajustando-se o modelo de variáveis do *NAT2* para os genótipos de acetilação: lento, intermediário e rápido. Ao analisar o perfil de genótipos de acetilação *NAT2*, verificou-se que os acetiladores lentos (**5*5* + *5*6* + **5*7* + **6*6* + **6*7*) apresentaram 2,0 vezes mais risco de RAM ($p=0,041$) que os acetiladores rápidos (*NAT2*4*4*) (Tabela 34).

A relação entre RAM e as variantes *CYP2E1* e de *GST*, assim como as características biodemográficas e clínicas dos indivíduos com tuberculose foi também testada por análise de regressão logística. Nenhuma destas variáveis foi associada com a manifestação de RAM conforme os dados da tabela 35.

Tabela 34. Análise de regressão logística das variantes do *NAT2* associadas com reações adversas a medicamentos (RAM).

| Variável | <i>p</i> | Odds Ratio | Intervalo de Confiança [95%] |
|----------------------------------|--------------|--------------|------------------------------|
| NAT2 | | | |
| NAT2*4/*4 (ref.) | 0,153 | | |
| NAT2*4/*5 | 0,040 | 2,375 | [1,040 ; 5,425] |
| NAT2*4/*6 | 1,000 | 1,000 | [0,351 ; 2,851] |
| NAT2*4/*7 | 0,341 | 0,333 | [0,035 ; 3,205] |
| NAT2*5/*5 | 0,038 | 5,000 | [1,096 ; 22,820] |
| NAT2*5/*6 | 0,323 | 1,667 | [0,606 ; 4,586] |
| NAT2*5/*7 | 0,341 | 0,333 | [0,035 ; 3,205] |
| NAT2*6/*6 | 0,423 | 2,000 | [0,366 ; 10,919] |
| NAT2*6/*7 | 1,000 | $e^{21,2}$ | [> 0] |
| NAT2*12 | | | |
| *4/*4 (ref.) | 0,590 | | |
| 4*/12* + 12*/12* | 0,591 | 1,214 | [0,599 ; 2,463] |
| NAT2*13* | | | |
| *4/*4 (ref.) | 0,800 | | |
| 4*/13* + 13*/13* | 0,796 | 0,875 | [0,317 ; 2,413] |
| Perfil de acetilação NAT2 | | | |
| Rápido (*4/*4) (ref.) | 0,051 | | |
| Intermediário | 0,183 | 1,500 | [0,826 ; 2,723] |
| Lento | 0,041 | 2,000 | [1,028 ; 3,892] |

Tabela 35. Análise de regressão logística das variantes *CYP2E1* e *GST* e outras variáveis associadas com reações adversas a medicamentos (RAM).

| Variável | <i>p</i> | Odds Ratio | Intervalo de Confiança [95%] |
|--------------------------------|----------|------------|------------------------------|
| <i>CYP2E1</i> | | | |
| *1A/*1A (ref.) | 0,712 | | |
| *1A/*5B | 0,410 | 0,625 | [0,204 ; 1,910] |
| *1A/*1B | 1,000 | 1,000 | [0,063 ; 15,988] |
| <i>GST</i> | | | |
| <i>GSTM1*1/GSTT1*1</i> (ref.) | 0,185 | | |
| <i>GSTM1*1/GSTT1*0</i> | 0,327 | 2,000 | [0,500 ; 7,997] |
| <i>GSTM1*0/GSTT1*1</i> | 0,074 | 1,750 | [0,947; 3,234] |
| <i>GSTM1*0/GSTT1*0</i> | 0,413 | 1,313 | [0,685 ; 2,515] |
| Gênero (Masculino ref.) | | | |
| Feminino | 0,289 | 0,644 | [0,286 ; 1,453] |
| Idade | | | |
| < 50 anos (ref.) | 0,609 | | |
| ≥50 anos | 0,661 | 1,328 | [0,374 ; 4,713] |
| Etnia (Branco ref.) | | | |
| Não Brancos | 0,176 | 0,567 | [0,249 ; 1,289] |
| Etilismo | | | |
| Não (ref.) | 0,987 | | |
| Sim | 0,757 | 1,556 | [0,094 ; 25,664] |

5. DISCUSSÃO

O tratamento da tuberculose consiste de isoniazida, rifampicina e pirazinamida como os principais fármacos incluídos nos esquemas terapêuticos. Esses fármacos apresentam um potencial hepatotóxico que pode ocasionar hepatite induzida por medicamento (WHO, 2003).

Estudos de meta-análise envolvendo o uso de diferentes regimes para o tratamento da tuberculose em adultos mostraram uma incidência de toxicidade hepática de 2,6% com H, administrada concomitantemente com R, mas somente 1,1% com R e 1,6% com H em monoterapia, respectivamente (YEW, 2001).

Neste estudo, alterações dos valores médios dos parâmetros bioquímicos ALT, AST, ALP, GGT e Bilirrubina direta apresentaram-se elevados significativamente ($p < 0,05$) no 2º mês de tratamento, quando comparado aos valores médios do período pré-tratamento. Essas alterações variaram de 1 a 10 vezes o limite superior de referência.

A frequência dos relatos de reações adversas também foi maior no 2º mês de tratamento, tendo sido relatados por 63,8% dos pacientes. Desses casos, 51,2% acometeram o sistema gastrointestinal provocando vômitos, gastrite e/ou azia. Quando avaliamos o uso de medicação concomitante em conjunto ao tratamento com antimicobacterianos, observamos que o risco de um indivíduo apresentar RAM quando se faz uso de medicação concomitante é 5,6 vezes maior (OR: 5,6; 95% Intervalo de Confiança: 2,98 – 10,45). A co-administração de medicamentos pode resultar em alterações qualitativas e quantitativas no metabolismo dos fármacos e é

muito difícil excluir a presença deste co-fator ao se avaliar a hepatotoxicidade induzida por fármacos (CHO *et al.*, 2007)

A presença de RAM foi relacionada com o aumento de todos os marcadores bioquímicos (de lesão hepática e colestase) no 2º mês de tratamento quando comparados com os indivíduos sem RAM ($p < 0,05$). O uso das medicações para o tratamento da tuberculose é relacionado com a susceptibilidade à hepatite induzida por fármacos e consecutivamente elevação dos marcadores de dano hepático que são sugestivos de que a hepatite induzida por fármacos ocorre normalmente nas primeiras semanas ou meses do esquema intensivo de tratamento para tuberculose (YEW & LEUNG, 2006).

As alterações de marcadores de lesão hepatocelular (ALT e AST) e colestase (Bilirrubinas, ALP e GGT), na fase inicial do tratamento, confirmam os resultados de outros estudos que descreveram a hepatite induzida por antimicobacterianos nas primeiras semanas ou meses de tratamento (HUSSAIN *et al.*, 2003; SEGADO *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2007). Esses resultados foram diferentes dos encontrados por HIGUCHI e colaboradores (2007), onde diferenças nos parâmetros bioquímicos não foram observadas entre os grupos com e sem RAM.

Os dados obtidos mostram claramente a importância do acompanhamento clínico e laboratorial regular dos pacientes em tratamento para tuberculose para uma correta adequação dos esquemas de tratamento de modo a preservar a função hepática principalmente nos dois primeiros meses de tratamento (YEW & LEUNG, 2006). A conduta indicada varia de acordo com os sinais e sintomas apresentados bem como com a severidade do quadro clínico, podendo levar à suspensão

temporária de uma ou mais medicações do esquema até resolução do quadro, alteração de dose e substituição de algumas medicações ou do esquema completo.

A frequência de acetiladores lentos (39,4%) nesse estudo foi menor do que a encontrada em estudos prévios, onde o perfil de acetilador lento é observado em 50,0% dos indivíduos caucasianos (AGUNDEZ *et al.*, 1994) e de 49,0% na população brasileira (TEIXEIRA *et al.*, 2007). A menor frequência de acetiladores lentos pode estar associada com a baixa frequência do SNP *NAT2*6* (21,7%) e a alta frequência do *NAT2*4* (37,9%). A frequência do SNP *NAT2*6* (30,0%) e do SNP *NAT2*4* (23,1%) reportada por TEIXEIRA e colaboradores (2007) foi significativamente maior e menor respectivamente, do que a encontrada no nosso estudo ($p= 0,01$ para o SNP *NAT2*6* e $p < 0,001$ para o SNP *NAT2*4*). As frequências dos outros alelos *NAT2* que caracterizam o perfil de acetilador lento não foram estatisticamente significantes.

Em um estudo recente na população brasileira, POSSUELO e colaboradores (2008) encontraram frequências ainda menores do perfil de lento acetiladores (27,2%), atribuindo esse achado também a baixa frequência do SNP *NAT2*6* (10,2%). Outros estudos realizados com populações da Argentina e Paraguai identificaram uma frequência ainda menor do SNP *NAT2*6* de 9,0% (BAILLET *et al.*, 2007) e por outro lado, a frequência observada em Europeus foi de 26,0% (AGUNDEZ *et al.*, 1994). Neste estudo, não observamos diferenças na distribuição dos genótipos *NAT2* entre os indivíduos brancos e não-brancos ($\chi^2 = 5,551$ $p= 0,062$).

Neste estudo, os alelos *NAT2*5*, *NAT2*6* e *NAT2*7* que caracterizam os genótipos de acetiladores intermediários e lentos foram relacionados com a

presença de RAM e com aumentos significativos nos valores séricos de ALT, AST, ALP, GGT e bilirrubinas no segundo mês de tratamento nos pacientes com RAM.

A presença do alelo *NAT2**5 em heterozigose conferiu 2 vezes mais risco e quando em homozigose 5 vezes mais risco de manifestação de RAM. Esse resultado confirma achados prévios de que a presença de um perfil de acetilação lenta de *NAT2* confere maior probabilidade de desenvolver RAM (CHO *et al.*, 2007). Com relação ao risco de hepatotoxicidade, também foi observada relação positiva com o genótipo de acetilador lento confirmando os achados de estudos prévios (HIGUCHI *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2002; HIRATSUKA *et al.*, 2002).

A análise dos haplótipos entre os polimorfismos *NAT2**5*6 e *NAT2**6*7 mostram que são mais freqüentes no grupo com relato de reações adversas e apresentam-se em desequilíbrio de ligação. Entretanto, como existem poucos genótipos *NAT2**5*6 e *NAT2**6*7 no grupo de estudo, estudos adicionais são necessários para confirmar esse resultado.

MITCHELL e colaboradores (1975) primeiramente especularam que os acetiladores rápidos (*NAT2**4/*4) eram os mais vulneráveis para desenvolver dano hepático, uma vez que os indivíduos portadores desse genótipo podem produzir hepatotoxinas mais rápido que os indivíduos classificados como acetiladores lentos. Por outro lado, diversos autores (HIGUCHI *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2007; HIRATSUKA *et al.*, 2002) mostraram o efeito protetor do alelo *NAT2**4 logo a sua ausência está associada ao maior risco de lesão hepático, devido a uma diminuição na velocidade de acetilação da isoniazida e seus metabólitos pela enzima *NAT2* e conseqüentemente a um acúmulo de hidrazina, principal composto associado ao

dano hepático (MORRONE *et al.*, 1993; FIUZA DE MELO *et al.*, 1996; CYNAMON *et al.*, 1994).

Uma série de outros estudos mostrou relação entre perfil de acetiladores lentos e hepatotoxicidade induzida pelos fármacos antituberculose em populações asiáticas (HUANG *et al.*, 2002; HIRATSUKA *et al.*, 2002; SCHIMIZU *et al.*, 2006) e recentemente na população brasileira (POSSUELO *et al.*, 2008). Em contraste, estudos realizados em caucasianos (VUILLEUMIER *et al.*, 2006) não conseguiram mostrar qualquer associação entre os genótipos de acetilador lento e hepatotoxicidade induzida pelos fármacos antituberculose (CHO *et al.*, 2007).

Todos esses achados suportam a hipótese da importância do perfil de acetilação na patogênese da hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose (POSSUELO *et al.*, 2008).

Para os polimorfismos do gene *CYP2E1*, observamos que o alelo mais freqüente foi o *CYP2E1*1A* (85,8%) e os menos freqüentes foram *CYP2E1*5B* (7,6%) e *CYP2E1*1B* (6,6%). As freqüências dos alelos raros *CYP2E1*1B* e *CYP2E1*5* foram similares às encontradas em outros estudos na população brasileira (0,5% a 5,0%) (ROSSINI *et al.*, 2002; ROSSINI *et al.*, 2006, PINTO *et al.*, 2003) e observamos que os polimorfismos *CYP2E1*B* e *CYP2E1*5B*, estão em desequilíbrio de ligação, concordando com ROSSINI e colaboradores (2006).

O alelo *CYP2E1*1B* é significativamente mais freqüente em brancos (7,0%) do que quando comparado com não brancos (3,0%) e é mais freqüente na população brasileira, quando comparado com outras populações principalmente Europeu (3,0% - 4,0%) e Africano (0,3% - 1,0%) (ROSSINI *et al.*, 2006, STEPHENS *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2001). Neste estudo, não observamos diferenças na

distribuição dos genótipos CYP2E1 entre os indivíduos brancos e não-brancos ($\chi^2 = 0,130$; $p=0,719$).

Um efeito bifásico na atividade da CYP2E1 é exercido pela H, dependendo do tempo de exposição (ZAND *et al.*, 1993). Durante a administração da H, a atividade da CYP2E1 é inibida (DESTA *et al.*, 2001). Entretanto, indução da atividade da CYP2E1 ocorre após descontinuação da H (PARK *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 1985).

Indivíduos com o genótipo *CYP2E1*1A*1A* apresentam maior atividade enzimática, que os indivíduos portadores dos alelos *CYP2E1*1B* ou *CYP2E1*5B* e, portanto podem gerar mais hepatotoxinas e aumentar o risco de hepatotoxicidade (HUANG *et al.*, 2007). Porém diferenças significativas na atividade da CYP2E1 em pacientes com genótipo *CYP2E1*1A*1A* não foram encontradas quando comparado com os outros genótipos (*CYP2E1*1A*5* ou *CYP2E1*5*5*) (HUANG *et al.*, 2003).

De acordo com WONG e colaboradores (2000), o alelo *CYP2E1*1B* e *CYP2E1*5* estão associados com um possível efeito protetor na doença hepática alcoólica e a sua ausência foi relacionada com a susceptibilidade de desenvolver hepatotoxicidade induzida pela H (HUANG *et al.*, 2003). Embora o papel dos polimorfismos da *CYP2E1* possa ser diferente na doença hepática alcoólica e na hepatotoxicidade induzida pela H, esses achados reforçam a hipótese e enfatizam o papel da *CYP2E1* na geração de compostos hepatotóxicos (MITCHELL *et al.*, 1976).

Neste estudo, não encontramos associação entre o genótipo *CYP2E1*1A*1A* e a presença de RAM ou hepatotoxicidade, entretanto os indivíduos com RAM e portadores do genótipo *CYP2E1*1A*1A* apresentam alterações importantes no 2º mês de tratamento nos marcadores de lesão hepatocelular (ALT e AST) e colestase (bilirrubinas, ALP e GGT), sugerindo que o alelo *CYP2E1*1A* é principal fator de

risco associado as alterações dos marcadores hepáticos. VUILLEUMIER e colaboradores (2006) também não encontraram relação significativa entre o genótipo de risco *CYP2E1*1A/*1A* e a hepatotoxicidade induzida por H em uma população heterogênea. Uma suposição levantada por esses autores foi o número limitado de indivíduos estudados o que ocasionou a um erro de tipo II e aos diferentes tratamentos usados para o tratamento da tuberculose em indivíduos Asiáticos e Europeus uma vez que a combinação de fármacos no tratamento da tuberculose pode aumentar a incidência de hepatotoxicidade em até 35% (MANDELL, 1996; WONG, 2000).

Estes resultados são sugestivos de que as variantes da região promotora do *CYP2E1* não têm um papel importante na susceptibilidade à lesão hepática induzida por antimicobacterianos.

Embora as enzimas GST ocupem uma posição importante no processo de detoxificação biológico, duas das mais importantes isoenzimas, *GSTM1* e a *GSTT1* apresentam deleção dos seus respectivos genes em uma grande parcela da população (BOLT *et al.*, 2006). A deleção desses genes são toxicologicamente importantes e a interação dos polimorfismos genéticos do *GSTM1* e *GSTT1* com as hepatotóxicas derivadas da metabolização da H devem ser avaliadas como um risco potencial de desenvolver hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose (LEIRO *et al.*, 2008).

As freqüências dos alelos *GSTM1*1* (26,8%) e *GSTT1*1* (40,9%), neste estudo foram similares as observadas em outro estudo da população brasileira (*GSTM1*1*: 22,7% e *GSTT1*1*: 42,1%) (ROSSINI *et al.*, 2002). Não observamos

diferenças na distribuição dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* entre os indivíduos brancos e não-brancos ($\chi^2 = 0,804$ $p = 0,370$).

Alguns estudos demonstraram diferenças étnicas nas frequências de *GSTM1*1*, *GSTT1*1* e dos genótipos nulos (*GSTM1*0* e *GSTT1*0*) (WORMHOUDT, 1999). Entretanto diferenças nas distribuições dos genótipos *GST* não foram encontradas na população brasileira, provavelmente devido à grande variabilidade étnica dessa população (GATTAS *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2004; ROSSINI *et al.*, 2002).

As variantes nulas dos genes *GSTM1*1* e *GSTT1*1* não foram relacionadas com a manifestação de RAM ou presença de hepatotoxicidade, no grupo de estudo. Entretanto, os indivíduos com RAM e portadores de pelo menos um genótipo nulo (*GSTM1*0* e/ou *GSTT1*0*) apresentaram maiores níveis médios de GGT no 2º mês de tratamento.

Os genótipo *GSTM1*1/GSTT1*1* foi associado a um aumento de 2 vezes nos valores médios de ALT, AST e ALP, no 2º mês de tratamento, quando comparado com os genótipos nulos em homozigose ou heterozigose.

Esses resultados indicam que a presença do genótipo *GSTM1*1/GSTT1*1* está associada à lesão hepatocelular marcante e colestase, o que é contrário aos achados do estudo de ROSSINI e colaboradores (2002). Esses autores relataram que as variantes nulas estão associadas com a dificuldade de detoxificar fármacos pelas vias metabólicas reguladas pelos genes *GSTM1* e *GSTT1* por perderem a atividade da enzima, eliminam os compostos tóxicos com menor eficiência e então apresentam um grande risco de desenvolver hepatite induzida por fármaco (SIMON *et al.*, 2000; STRANGE *et al.*, 2000).

Por outro lado, FUKINO e colaboradores (2008) mostraram que as concentrações séricas de hidrazina foram menores nos indivíduos portadores do genótipo nulo *GSTT1*0* quando comparados com as concentrações séricas dos indivíduos portadores do genótipo *GSTM1*1/GSTT1*1*. Este achado suporta então que a presença do genótipo nulo *GSTT1*0* pode ter um papel protetor da função hepática uma vez que as concentrações de hidrazina são menores.

6. CONCLUSÕES

O tratamento da tuberculose foi associado com alta taxa de reações adversas e a alterações acentuadas nos marcadores de lesão hepática, confirmando a sua alta hepatotoxicidade.

Os alelos *NAT2**4 e *NAT2**6 apresentaram maior e menor frequência, respectivamente, quando comparados com outros estudos na população brasileira. Os alelos variantes *CYP2E1* e *GSTM1* e *GSTT1* apresentaram frequências similares às de outros estudos de nossa população.

O perfil de acetilador lento da *NAT2* (alelos *NAT2**5, *NAT2**6 e *NAT2**7) foi associado com a manifestação de reações adversas e de hepatotoxicidade. O alelo *NAT2**5 foi o que mais contribuiu para o risco de RAM.

Os genótipos funcionais *GSTM1**1 e *GSTT1**1 foram associados com alterações acentuadas nos marcadores de lesão hepatocelular e colestase.

Os polimorfismos da região promotora do *CYP2E1* não foram associados a alterações no perfil bioquímico de indivíduos com RAM e o alelo *CYP2E1**1A não foi associado com risco de RAM ou hepatotoxicidade.

7. BIBLIOGRAFIA

ACHARYA, S.K.; DASARATHY, S.; KUMER, T.L., *et al.* Fulminant hepatitis in a tropical population: clinical course, cause, and early predictors of outcome. **Hepatology**. v.23, n.6, p.1448-1455, 1996.

AGUNDEZ, J.A.G.; MARTINEZ, C.; OLIVEIRA, M.; LEDESMA, M.C.; LADERO, J.M.; BENITEZ, J. Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population. **Clin Pharmacol Ther.** v.56, p.202-209, 1994.

BAILLET, G.; SANTOS, M.R.; ALFARO, E.L.; DIPIERRI, J.E.; DEMARCHI, D.A.; CARNESE, F.R.; BIANCHI, N.O. Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. **Mutat Res.** v.627, p.171-177, 2007.

BALCELLS, M.E.; THOMAS, S.L.; GODFREY-FAUSSETT, P.; GRANT, A.D. Isoniazid preventive therapy and risk for resistant tuberculosis. **Emerg. Infect. Dis.** v.12, p.744-51, 2006.

BELL, D.A.; TAYLOR, J.A.; BUTLER, M.A.; STEPHENS, E.A.; WIEST, J.; BRUBAKER, L.H.; KADLUBAR, F.F.; LUCIER, G.W. Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. **Carcinogenesis**. v.14,n.8, p.1689-1692, 1993.

BOLT, H.M.; THEIR, R. Relevance of the deletion polymorphisms of glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. **Current Drug Metabolism**. v.7, p.613-628, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Controle da tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço**. 5ª Ed. Rio de Janeiro. FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 6ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005.**

* De acordo com as "Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso". Vânia M. B. de Oliveira Funaro, *et al.*, São Paulo, SiBi-USP, 2004.

BROOKE, E.W.; DAVIES, S.G.; MULVANEY, A.W.; POMPEO, F.; SIM, E.; VICKERS, R.J. An Approach to Identifying Novel Substrates of Bacterial Arylamine *N*-Acetyltransferases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.11, p.1227-1234, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Update: Adverse event data and revised American Thoracic Society / CDC recommendations against the use of rifampin and pyrazinamide for treatment of latent tuberculosis infection. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.52, n.31, p.735-9, 2003.

CHEN, H.; SANDLER, D.P.; TAYLOR, J.A.; SHORE, D.L.; LIU, E.; BLOOMFIELD, C.D.; BELL, D.A. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with *glutathione transferase theta 1 (GSTT1)* gene defect. **Lancet**. p.347:295, 1996.

CHO, H-J.; KOH, W-J.; RYU, Y-J.; KI, C-S.; NAM, M-H.; KIM, J-W.; LEE, S-Y. Genetic polymorphisms of *NAT2* and *CYP2E1* associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**. v.87, p.551-556, 2007.

COLOMBO, J.; ROSSIT, ARB.; CAETANO, A.; BORIM, A.A; WORNATH, D.; SILVA, A.E. *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. **World J Gastroenterol**. v.10,n.9, p. 1240-1245, 2004.

CROSS, F.S.; LONG, M.W.; BANNER, A.S.; SNIDER, D.E. Rifampin-isoniazid therapy of alcoholic and nonalcoholic tuberculosis patients in U.S. public health service cooperative therapy trial. **American Review of Respiratory Disease**. v.122, p.349-353, 1980.

CYNAMON, M.H.; KLEMENS, S.P. Chemotherapeutic agents for mycobacterial infections *in*: Friedman LN [Ed]. Tuberculosis current concepts and treatment. **CRC Press**, USA. cap.11, p.37-250, 1994.

DALCOLMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PICON, P.D. In: **Revista de Saúde Pública: Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle**, v.41, n.1, p. 34-42, 2007.

DALY A.K.; FAIRBROTHER A.S.; SMART J. Recent advances in the understanding the molecular basis of polymorphisms and genes encoding cytochrome P450 enzymes. **Toxicol Lett**. v.102/103, p.143-147, 1998.

DESTA, Z.; SOUKHOVA, N.V.; FLOCKHART, D.A. Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A. **Antimicrob Agents Chemother**. v.45, p.382-392, 2001.

DGKC – **Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.** v.10, p.281-91, 1972.

DYE, C.; ESPINAL, M.A.; WATT, C.J.; MBIAGA, C.; WILLIAMS, B.G. Worldwide incidence of multi-drug resistant tuberculosis. *Communicable diseases, WHO. J. Infect. Dis.*, v.185, p.1197-202, 2002.

EATON DL. Biotransformation enzyme polymorphism and pesticide susceptibility. **Neurotoxicology.** v.21, p.101-111, 2000.

ELLEARD, G.A. A slow-release preparation of isoniazid: pharmacological aspects. **Bull Int Union Tuberc.** v.51, p.143-154, 1976.

ESPINAL, M.A.; LASERSON, K.; CAMACHO, M.; FUSHENG, Z.; KIM, S.J.; TLALI, E.; SMITH, I.; SUAREZ, P.; ANTUNES, M.L.; GEORGE, A.G.; MARTIN-CASABONA, N.; SIMELANE, P.; WEYER, K.; BINKIN, N.; RAVIGLIONE, M.C. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.** v.5,n.10, p.887 – 893, 2001.

FILHO, C.A.; KRITSKI, A.L.; BARRETO, A.W.; LEMOS, A.C.M.; NETO, A.R.; GUIMARAES, C.A.; SILVA, C.L. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. **J. Bras Pneumol.** v.30, Suppl I, 2004.

FIÚZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B.; KRITSKI, A.L.; HIJJAR, M.A.; SEISCENTO, M. Tuberculose *in* Veronesi R, Focaccia R [Eds.] **Tratado de Infectologia.** São Paulo, Editora Atheneu, cap.74, p.914-59, 1996.

FUKINO, K.; SASAKI, Y.; HIRAI, S.; NAKAMURA, T.; HASHIMOTO, M.; YAMAGISHI, F.; UENO, K. Effects of N-acetyltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 and Glutathione-S-transferase (GST) genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients. **J. Toxicol. Sciences.** v.33, n.2, p.187-195, 2008.

GARG, P.K.; TANDON, R.K. Antituberculosis agents-induced liver injury. In: Drug induced Liver Disease. Kaplowitz, N., Deleve, L.D., Marcel Dekker. **A concise review of antituberculosis drug-induced hepatitis in the textbook edited by the authoritative experts in this field.** New York, USA, p.505-517, 2003.

GARTE, S.; GASPARINI, L.; ALEXANDRIE, A.K.; *et al.* Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. **Cancer Epidemiol Biomark.** v.10, p.1239-1248, 2001.

GATTAS, G.J.F.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J.A.; SIRAQUE, M.S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M.A.V.; BYDLOWSKI, S.P. Ethnicity and glutathione S-

transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.37, p.451-458, 2004.

GURUMURTHY, P.; KRISHNAMURTHY, M.S; NAZARETH, O.; PARTHASARATHY, R.; SARMA, G.R.; SOMASUNDARAM, P.R.; TRIPATHY, S.P.; ELLARD, G.A. Lack of Relationship between Hepatic Toxicity and Acetylator Phenotype in Three Thousand South Indian Patients during Treatment with Isoniazid for Tuberculosis. **Am Rev Respir Dis.** v.129, p.58-61, 1983.

HAYASHI, S.; WATANABE, J.; KAWAJIRI, K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of human cytochrome P450E1 gene. **J Biochem.** v.110, p.559-565, 1991.

HAYES, J.D.; STANGE, R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology.** v.61, p.154-166, 2000.

HEIN, D.W. Molecular genetics and function of *NAT1* and *NAT2*: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. **Elsevier.** p.65-77, 2002.

HIGUCHI, N.; TAHARA, N.; YANAGIHARA, K.; FUKUSHIMA, K.; SUYAMA, N.; INOUE, Y.; *et al.* *NAT2*6A*, a haplotype of the *N*-acetyltransferase 2 gene, is an important biomarker for risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. **World J Gastroenterol.** v.13,n.45, p.6003-6008, 2007.

HIJJAR, M.A.; OLIVEIRA, M.J.P.R.; TEIXEIRA, G. A tuberculose no Brasil e no mundo. **Bol. Pneumol. Sanit.** Rio de Janeiro, v.9,n.2, p.9-16, 2001.

HIRATSUKA, M.; KISHIKAWA, Y., TAKEKUMA, Y.; *et al.* Genotyping of the *N*-acetyltransferase 2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. **Drug Metab Pharmacokinet.** v.17, p.357-362, 2002.

HORDER, M.; JORGENSEN, P.J.; HAFKENSCHIED, J.C.; CARSYENSEN, C.A.; BACHMANN, C.; BAUER, K.; NEUWALD, C.; ROSALKI, S.B.; FOO, A.Y.; VOGT, W. Creatinine kinase determination: a European evaluation of the creatinine kinase determination in serum, plasma and whole blood with the Reflotron system. **Eur. J. Clin. Chem.** v.29,n.10, p.691-696, 1991.

HUANG, Y.S; CHERN, H.D.; SU, W.J; *et al.* Polymorphism of the *N*-Acetyltransferase 2 Gene as a Susceptibility Risk factor for Antituberculosis Drug-Induced Hepatitis. **Hepatology.** v.35, p.883-889, 2002.

HUANG, Y.; CHERN, H.; SU, W.; WU, J.; CHANG, S.; CHIANG, C.; CHANG, F.; LEE, S. Cytochrome P450 2E1 genotype and the Susceptibility to Antituberculosis Drug-Induced Hepatitis. **Hepatology**. v.37, p.925-930, 2003.

HUANG, Y.. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. **Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.** v.3,n.1, p.1-8, 2007.

HUSSAIN, Z.; KAR, P.; HUSAIN, S.A. Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. **Indian. J. Exp. Biol.** v 41, p.1226-1232, 2003.

JENDRASSIK, L.; GROF, P. **Biochem.** v.297, p.91-99, 1938.

KARMEN, A.; WROBLEWSKI, F.; LADUE, J.S. Transaminase activity in human blood. **J. Clin. Invest.** v.34,n.1, p.126-131, 1955.

KUMAR, A.; MISRA, P.K.; MEHOTRA, R.; GOVIL, Y.C.; RANA, G.S. Hepatotoxicity of rifampicin and isoniazid. **Am. Ver. Respir. Dis.** v.143, p.1350-1352, 1991.

LEIRO, V.; FERNANDEZ-VILLAR, A.; VALVERDE, D.; CONSTELA, L.; VÁZQUEZ, R.; PIÑEIRO, L.; GONZÁLEZ-QUINTELA, A. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a caucasian population. **Liver International ISSN.** p.1478-3223, 2008.

LIU, S.; PARK, J.Y.; SCHANTZ S.P.; *et al.* Elucidation of CYP2E1 5' regulatory *RsaI/PstI* allelic variants and their role in risk for oral cancer. **Oral oncology.** v.37, p.437-445, 2001.

MANDELL, G.L.; PETRI, W.A. Antimicrobial agents. In: Goodman G (eds). **The pharmacological basis of therapeutics 9th edn.** Donnelley and Sons, Chicago, Ill., p.1155-1174, 1996.

MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.98,n.4, p.1901-1906, 2001.

MITCHELL, J.R.; THORGEIRSSON, U.P.; BLACK, M.; *et al.* Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydrazine metabolites. **Clin. Pharmacol. Ther.** v.18,n.1, p.70-79, 1975.

MITCHELL, J.R.; ZIMMERMAN, H.J.; ISHAK, K.G.; THORGEISSON, U.P., TIMBRELL, J.A.; SNODGRASS, W.R.; NELSON, S.D. Isoniazid Liver injury: clinical spectrum, pathology and probable pathogenesis. **Ann. Intern. Med.** v.84, p.181-192, 1976.

MITCHINSON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **Tubercle Lung Dis.**, v.2, n.1, p.10-15, 1998.

MORRONE, N.; MARQUES, J.F.; FAZOLO, N.; SOARES, L.C.P.; MACEDO, L. Reações adversas das drogas tuberculostáticas. **J. Pneumol.** v.19, p.52-9, 1993.

MOUSSA, L.A.; KHASSOUANI, C.E.; SOULAYMANI, R.; JANA, M.; CASSANAS, G.; ALRIC, R.; HÜE, B. Therapeutic isoniazida monitoring using a simple high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life Sci.** v.766,n.1, p.181-7, 2002.

NIEMI, M.; BACKMAN, J.T.; FROMM, M.F.; NEUVONEN, P.J.; KIVISTO, K.T.; Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance. **Clinic. Pharmacokinet.** v.42,n 9, p.819-850, 2003.

PALOMINO, J-C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. From basic science to patient care. **Tuberculosis 2007**, 687p., 2007.

PANDE, J.N.; SINGH, S.P.N.; KHILNANI, G.C.; KHILNANI, S.; TANDON, R.K. Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. **Thorax**, v.51,n.2, p.132-136, 1996.

PEMBLE, S.; SCHROEDER, K.R.; SPENCER, S.R.; MEYER, D.J.; HALLIER, E.; BOLT, H.M.; KETTERER, B. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochem. J.** v.300, p.271-276, 1994.

PINTO, L.F.R.; ROSSINI, A.M.T.; ALBANO, R.M.; FELZENSZWALB, I.; GALLO, C.V.M.; NUNES, R.A.N.; ANDREOLLO, NELSON.A. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. **Mutation Research.** v.544, p.365-373, 2003.

PARK, K.S.; SOHN, D.H.; VEECH, R.L.; SONG, B.J. Translation activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (*CYP2E1*) by isoniazid. **Eur J Pharmacol.** v.248, p. 7-14, 1993.

POSSUELO, L.G.; CASTELAN, J.A.; DE BRITO, T.C.; RIBEIRO, A.W.; CAFRUNE, P.I; PICON, P.D.; SANTOS, A.R.; TEIXEIRA, R.L.F.; GREGIANINI, T.S.; HUTZ,

M.H.; ROSSETI, M.L.R.; ZAHA, A. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. **Eur. J. Clin. Pharmaciol.** v.64, p.673-681, 2008.

RODRIGUES, L.; BARRETO, M.; KRAMER, M.; BARATA, R.C.B. Resposta brasileira à tuberculose: contexto, desafios e perspectivas. **Revista de Saúde Pública.** v.41,n.1, p.1-2, 2007.

RODRIGUES-LIMA, F. & DUPRET, J. 3D Model of Human Arylamine N-acetyltransferase 2: structural basis of the slow acetylator phenotype of the R64Q variant and analysis of the active-site loop. **Biochem. Bioph. Res. Comm.** v.291, p.116-123, 2002.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D.C.M.; AMORIM, L.M.F.; MACEDO, J.M.B.; MEDINA, R.; NETO, J.F.N.; GALLO, C.V.M.; PINTO, L.F.R. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genet. Mol. Res.** v.3, p.233-240, 2002.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D.C.M.; FARIA, M.; ALBANO, R.M.; PINTO, L.F.R. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. **Brazilian J. Med. and Biological Res.** v.39, p.195-201, 2006.

ROY, B. Anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity and genetic polymorphisms in drug-metabolizing genes. **Pharmacogenomics**, v.1,n.2, p.101-109, 2003.

ROY, B.; CHOWDHURY, A.; KUNDU, S.; SANTRA, A.; DEY, B.; CHAKRABORTY, M.; MAJUMDER, PP. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 "null" mutation. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v.16, p.1033-1037, 2001.

RYAN, D.E.; RAMANATHAN, L.; IIDA, S.; THOMAS, P.E.; HANIU, M.; SHIVELY, J.E.; LIEBER, C.S.; *et al.* Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome p-450 induced by isoniazid. **J. Biol Chem.** v.260, p.6385-6393, 1985.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem.** v 44, p.1748-50, 1998.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. cap. 7, p.7.9-7.12 e 7.43-7.45, 2001.

SCHIMIZU, Y.; DOBASHI, K.; MITA, Y.; *et al.* DNA microarray genotyping of N-acetyltransferase 2 polymorphism using carbodiimide as the linker for assessment of isoniazid hepatotoxicity. **Tuberculosis**. v.86, p.374-381, 2006.

SEGADO, S.A.; SANTIAGO, D.C.; BANARES, C.R.; ALVAREZ, F.E.; BRANDES, M.F.; GOMEZ-GALLEGO, F. Genetic susceptibility to the development of acute alcoholic hepatitis: role of genetic mutations in dehydrogenase alcohol, aldehyde dehydrogenase and cytochrome P450 2E1. **Rev. Clin. Esp.** v.205, p.528-532, 2005.

SMITH, C.A.D.; WADELIUS, M.I.A.; GOUGH, A.C.; HARRISON, D.J.; WOLF, C.R.; ANDERS, A. Simplified assay for the arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism validates by phenotyping with isoniazid. **J. Med. Genet.** v.34, p.758-760, 1997.

SIMON, T.; BECQUEMONT, L.; MARYPKRAUSE, M.; *et al.* Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tracrine hepatotoxicity. **Clin. Pharmacol. Ther.** v.67,n.4, p.432-437, 2000.

STRANGE, R.C.; JONES, P.W.; FRYER, A.A. Glutathione S-transferase genetics and role in toxicology. **Toxicolol. Lett.** v.112-113, p.357-363, 2000.

SSCC – Comitê de Enzimas da Sociedade Escandinava de Química Clínica (SSCC) – **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** v.36, p.119, 1976.

STEPHENS, E.A.; TAYLOR, J.A.; KAPLAN, N.; *et al.* Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis in 695 African-americans, European-americans and Taiwanese. **Pharmacogenetics**. v.4, p.185-192, 1994.

SUN, C.A.; WANG, L.Y.; CHEN, C.J.; LU, S.N.; YOU, S.L.; WANG, L.W.; WANG, Q.; WU, D.M.; SANTELLA, R.M. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases M1 and T1 associated with susceptibility to aflatoxin-related hepatocarcinogenesis among chronic hepatitis B carriers: a nested case-control study in Taiwan. **Carcinogenesis**, v.22, p.1289-1294, 2001.

TEIXEIRA, R.L.F.; MIRANDA, A.B.; PACHECO, A.G.; LOPES, M.Q.P.; FONSECA-COSTA, J.; RABAHI, M.F.; MELO, H.M.; KROTSKI, A.L.; MELLO, F.C.Q.; SUFFYS, P.N.; SANTOS, A.R. Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. **Mutation Research**. v.624, p.31-40, 2007.

UPTON, A.; JOHNSON, N.; SANDY, J.; SIM, E. Arylamine N-acetyltransferases – of mice, men and microorganisms. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.22,n.3, p.140-146, 2001.

VUILLEUMIER, N.; ROSSIER, M.F.; CHIAPPE, A.; DEGOUMOIS, F.; DAYER, P.; MERMILLOD, B.; NICOD, L.; DESMEULES, J.; HOCHSTRASSER, D. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** v.62, p.423-429, 2006.

WATANABE, J.; HAYASHI, S.; KAWAJIRI, K. Different regulation and expression of human CYP2E1 gene due to RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. **J. Biochem.** v.116, p.321-326, 1994.

WONG, N.A.C.S.; RAE, F.; SIMPSON, K.J.; MURRAY, G.D.; HARRISON, D.J. Genetic polymorphism of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta analysis. **J. Clin Pathol Mol Pathol.** v.53, p.88-93, 2000.

WONG, W.M.; WU, P.C.; YUEN, M.F.; CHENG, C.C.; YEW, W.W.; WONG, P.C. Antituberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. **Hepatology.** v.31, p.201-206, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing.** Report 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing (WHO/HTM/TB/2008.393).** Report 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New technologies for tuberculosis control: a framework for their adoption, introduction and implementation.** WHO/HTM/STB/2007.40.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2006.** WHO/HTM/TB/2006.362.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control.** Report 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Treatment of tuberculosis: Guidelines for National Programmes, 3rd edn.** WHO/CDS/TB/2003.313.

WORMHOUDT, L.W.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Crit. Rev. Toxicol.** v.29, p.59-124, 1999.

WROBLEWSKI, F.; LA DUE, J. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. **Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.** v.91, p.569, 1956.

WU, J-C.; LEE, S-D.; YEH, P-F.; CHAN, C-Y.; WANG, Y-J.; HUANG, Y-S.; TSAI, Y-T.; LEE, P-Y.; TING, L-P.; LO, K-J. Isoniazid-rifampicin-induced hepatitis in hepatitis B carriers. **Gastroenterology.** v.98, p.502-504, 1990.

YAMATOTO, T.; SUOU, T.; HIRAYAMA, C. Elevated serum aminotransferase induced by isoniazid in relation to isoniazid acetylator phenotype. **Hepathology.** v.6,n.2, p.295-298, 1986.

YEW, W.W. Risk factors for hepatotoxicity during antituberculosis chemotherapy in Asian populations. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.** v.5, p.99-100, 2001.

YEW, W.W. & LEUNG, C.C. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. **Respirology.** v.11, p.699-707, 2006.

YUE, J.; PENG, R.; CHEN, J.; LIU, Y.; DONG, G. Effects of rifampicin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats. **Pharmacological Research.** v.59, p.112-119, 2009.

ZAND, R.; NELSON, S.D.; SLATTERY, J.T.; THUMMEL, K.E.; KALHORN, T.F.; ADAMS, S.P.; WRIGHT, J.M. Inhibition and induction of cytochrome P450E1 catalyzed oxidation by isoniazid in humans. **Clin. Pharmacol. Ther.** v.54, p.142-149, 1993.

ZHU, S.M.; REN, X.F.; Wan, J.X.; XIA, Z.L. Evaluation in vinyl chloride monomer-exposed workers and the relationship between liver lesions and gene polymorphisms of metabolic enzymes. **World J. Gastroenterol.** v.11, p.5821-5827, 2005.

ZOU, G. & DONNER, A. The merits of testing Hardy-Weinberg Equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. **Annals of Human Genetics.** v.70, p.923-933, 2006.

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....
 Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
 Bairro:.....Cidade:.....
 CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....
 Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
 Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
 Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Projeto: VARIANTES GENÉTICAS DA N-ACETILTRANSFERASE: RELAÇÃO COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA A ISONIAZIDA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE.

Adendo 1: Estudo de variantes dos genes CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 em pacientes com tuberculose.

Adendo 2: Identificação de marcadores biológicos da tuberculose no sangue.

2. PESQUISADOR: Rosario Dominguez Crespo Hirata

Cargo/Função: Professor Associado / Docente

CRF Nº 8876

Departamento da FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas

Colaboradores na FCF/USP: Mario Hiroyuki Hirata, Elsa Masae Mamizuka, Francisco José Forestiero, Letícia Cecon

Colaboradores no Instituto Clemente Ferreira-SP: Fernando Fiúza de Melo e Céu Cordeiro Gonçalves Moura

Colaboradores na Universidade Estadual de Maringá-PR: Rosilene Fressatti Cardoso

Colaborador no Loma Linda Adventist Science Center (Loma Linda, CA, EUA):

Earl W. Ferguson

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

Sem Risco () Risco Mínimo (X) Risco Médio ()

Risco Baixo () Risco Maior ()

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 (três) anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Meu nome é Rosario Dominguez Crespo Hirata, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP-SP), e estou convidando você para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com pesquisadores do Serviço de Pneumologia do Instituto Clemente Ferreira (ICF-SP) e do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM-PR).

Nesta pesquisa vamos avaliar as características genéticas de um grupo de pessoas com tuberculose e verificar se estão relacionadas com os efeitos da isoniazida. A isoniazida é usada para tratar pessoas com tuberculose. Nós vamos pesquisar alterações genéticas (DNA) de enzimas (NAT2, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1) que ajudam a eliminar a isoniazida do organismo. Também vamos pesquisar substâncias (biomarcadores) no sangue para entender como o organismo dessas pessoas se defende da tuberculose, antes e durante o tratamento com isoniazida. Vamos fazer vários exames de sangue para medir os efeitos da isoniazida e verificar como seu organismo reage contra a tuberculose. Também serão feitos exames de escarro para verificar o tipo de bactéria que está causando a tuberculose. Esta pesquisa vai nos ajudar a conhecer porque algumas pessoas se sentem mal com os remédios usados no tratamento da tuberculose e outras não melhoram com o tratamento. Também vai ajudar a entender porque algumas pessoas melhoram bem depressa enquanto outras demoram mais para se curar da tuberculose.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Para você participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue e de escarro. Precisaréi também que você responda algumas perguntas sobre outras doenças que você tem, como é sua alimentação, que remédios você toma e outras informações suas e de pessoas de sua família.

Você terá que comparecer ao Serviço Médico onde está sendo atendido nove vezes e terá que tomar os medicamentos para tratar a tuberculose durante seis

meses. No primeiro dia, você vai comparecer ao serviço médico em jejum e vão ser coletadas amostras de escarro e de sangue (28 mL) para fazer os exames de laboratório, os testes genéticos (DNA) e de biomarcadores. Logo após, você vai tomar um comprimido de isoniazida e depois de 1, 2, 3, 4 e 5 horas vão ser coletadas amostras de sangue (2,5 mL/cada) para medir a atividade da enzima N-acetiltransferase. Depois disso, seu médico vai receitar os remédios que você vai tomar para o tratamento da tuberculose durante seis meses. Esses remédios serão fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Para o tratamento da tuberculose você será incluído ao acaso no grupo TB1 ou no grupo TB2. Os participantes do grupo TB1 vão tomar as doses de medicamentos estabelecidas pelo Ministério da Saúde do Brasil (isoniazida 10mg/kg/dia, rifampicina 10mg/kg/dia e pirazinamida 35mg/kg/dia, por 2 meses; e isoniazida 10mg/kg/dia e rifampicina 10mg/kg/dia, por 4 meses). Os participantes do grupo TB2 vão tomar doses diferentes e que são recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (isoniazida 5 mg/Kg/dia, rifampicina 5mg/kg/dia e pirazinamida 17,5mg/kg/dia, por 2 meses; e isoniazida de 5 mg/Kg/dia e rifampicina 5mg/kg/dia, por 4 meses).

Você vai voltar ao serviço médico 15 dias, 30 dias, 45 dias, 60 dias, 3 meses, 4 meses, 5 meses e 6 meses após ter começado o tratamento. Nessas consultas, você será atendido pelo seu médico e serão colhidas amostras de escarro e de sangue (23 mL) para os exames de laboratório.

3. Desconfortos e riscos esperados:

O risco para a sua saúde será mínimo por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Tomando os remédios para o tratamento da tuberculose, você poderá sentir algum mal estar como: náuseas, vômitos, dor de cabeça, dor nas juntas, ficar eufórico, ficar ansioso, ou não conseguir dormir direito. Se você tiver algum desses efeitos, avise o seu médico.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Os resultados da pesquisa trarão benefícios para a comunidade, esclarecendo porque algumas pessoas não melhoram da tuberculose ou desistem do tratamento. Esses resultados são importantes para ajudar os médicos a tratar de forma mais adequada os pacientes com tuberculose.

5. Custos:

Se você desejar participar desse estudo, você fará os exames de laboratório e receberá os remédios para tratar da tuberculose sem qualquer custo.

6. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Até o momento, não tem outra maneira de realizar este tipo de pesquisa.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Você ou seu responsável legal tem o direito de fazer qualquer pergunta sobre sua doença, remédios, procedimentos, riscos e benefícios ou outro aspecto qualquer com relação a pesquisa ou sobre seus direitos como paciente. Você e seu médico terão acesso aos detalhes da pesquisa e aos resultados dos exames de laboratório que ficarão disponíveis em seu prontuário. Caso seja de seu interesse, os resultados dos testes genéticos (DNA) e de biomarcadores também ficarão disponíveis ao final da pesquisa.
2. Sua participação nesta pesquisa é voluntária e você pode desistir de participar dela a qualquer momento sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico futuro não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá retirar seus dados genéticos do banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP onde serão guardados.
3. Os seus dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão mantidos em sigilo e somente serão revelados com seu consentimento. Somente os pesquisadores envolvidos na pesquisa terão acesso os resultados dos seus testes genéticos e de biomarcadores e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.).
4. Esta pesquisa não tem patrocinador, se você tiver alguma lesão ou doença relacionada com o uso dos medicamentos durante a pesquisa, você será atendido no Serviço Médico onde está cadastrado.
5. O material genético obtido nesse estudo somente será utilizado e armazenado para as finalidades descritas acima e caso nova pesquisa seja feita com o mesmo material, o protocolo da pesquisa deve ser submetido para aprovação do CEP da instituição e da CONEP e você deverá consentir de novo a utilização do seu material genético para um novo projeto. Todos os procedimentos relativos ao armazenamento do material segue a Resolução CNS 347/2005.

V. PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, pode entrar em contato comigo (telefones: 11-3091-3660 e 11-3091-3634) ou com Francisco José Forestiero (telefone: 11-3091-3660 e 11-8231-0018), no endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17 superior, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, de segunda a sexta-feira das 8 às 17 horas. Se você estiver cadastrado no Instituto Clemente Ferreira-SP, poderá também entrar em contato com o Dr. Fernando Fiúza de Melo do ou com a Dra. Céu Cordeiro Gonçalves Moura (telefone: 11-3257-8096), no endereço: Rua da Consolação, 717, Consolação, São Paulo, SP, de segunda a sexta-feira das 8 as 17 horas. Se você estiver cadastrado no Departamento de

Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, poderá também entrar em contato com a Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso (Disciplina de Bacteriologia) no telefone 44-261-4797, endereço: Avenida Colombo, 5790 Bloco J-90 sala 5, Maringá, PR. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP no telefone 11-3091-3677.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa e concordo que o material obtido seja utilizado nos testes de laboratório e nos testes genéticos (de DNA) e de biomarcadores descritos acima.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

ANEXOS

ANEXO A**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B

Currículo Lattes

Francisco Jose Forestiero

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Francisco Jose Forestiero

Nome em citações bibliográficas FORESTIERO, F. J.

Sexo Masculino

Filiação Antonio Luigi Forestiero e Maria de Lourdes Forestiero

Nascimento 13/01/1980 – São Paulo/SP - Brasil

Carteira de Identidade 30742414-5 ssp - SP

CPF 294 904 148 59

Endereço residencial Rua Dom Matheus, 55 ap. 94A
Vila Monumento - São Paulo
01548-030, SP - Brasil
Telefone: 11 8231 0018

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17, Laboratório de Biologia Molecular
Aplicada ao Diagnóstico
Butantã - Sao Paulo
05508-900, SP - Brasil
Telefone: 11 30913660
URL da home page: www.fcf.usp.br

Endereço eletrônico e-mail para contato : forestiero@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

2004 Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Variantes genéticas da N-acetiltransferase 2, CYP2E1 e Glutathione S-transferase: relação com a segurança terapêutica em pacientes com tuberculose

Orientador: Prof. Assoc. Rosario D. C. Hirata

Palavras-chave: NAT2. CYP2E1. GST. Reações Adversas A Medicamentos. Hepatotoxicidade.

Áreas do conhecimento: Biologia Molecular

1999 - 2003 Graduação em Farmácia-Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Quintiles Brasil Ltda.

Vínculo institucional

2007 - Atual Vínculo: Funcionária , Enquadramento funcional: Coordenador de Pesquisa Clínica , Carga horária: 40, Regime: Integral

Outras informações:
Coordenador de Estudos Clínicos na América Latina

2004 - 2007 Vínculo: Funcionária , Enquadramento funcional: Monitora de Pesquisa Clínica , Carga horária: 40, Regime: Integral

Outras informações:
Monitor de Estudos Clínicos Fases II e III, Internacionais e Multicêntricos

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2004 - Atual Vínculo: Pós Graduação , Enquadramento funcional: Doutorado, Regime: Parcial

Outras informações:
Desenvolvimento do projeto de doutorado "Variantes genéticas da N-acetiltransferase 2, CYP2E1 e Glutathione S- transferase: relação com a segurança terapêutica em pacientes com tuberculose"

2001 - 2002 Vínculo: Aluno de graduação , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Outras informações:
Desenvolvimento do projeto " Estudo do polimorfismo genético da apolipoproteína AI em indivíduos com hipercolesterolemia"

Desenvolvimento do projeto " Análise de Mutações em genes relacionados com resistência à isonizida em cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas em SP – Brasil"

Atividades

07/2004 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Participação em projetos:
"Variantes genéticas da N-acetiltransferase 2, CYP2E1 e Glutathione S- transferase: relação com a segurança terapêutica em pacientes com tuberculose"

2/2001 - 9/2002 Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Participação em projetos:
Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Iniciação Científica: Biologia Molecular.

6/2001 - 6/2002

Participação em projetos:
Análise de Mutações em genes relacionados com resistência à isonizida em cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas em SP - Brasil

Estudo do polimorfismo genético da apolipoproteína AI em indivíduos com hipercolesterolemia

- 03/2001 - 11/2001** Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Especificação:
 Membro da Comissão Organizadora da XXXVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB)
- 02/2001 - 09/2002** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Estágio:
Iniciação Científica: Treinamento de Estudantes de Graduação em Técnicas Especializadas, realizado no LPD-Biomol da FCF-USP
- 9/2001 - 10/2001** Extensão universitária, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
 Atividade de extensão realizada
 Campanhas de Diabetes e Colesterol.

Projetos

2004 - Atual **Variantes genéticas da N-acetiltransferase 2, CYP2E1 e Glutathione S-transferase: relação com a segurança terapêutica em pacientes com tuberculose”**

Diferenças no perfil de metabolização de drogas, como a isoniazida, têm sido observadas em portadores de variantes da enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 e Glutathione S-transferase. Com a finalidade de avaliar a relação entre variantes do gene *NAT2*, *CYP2E1* e *Glutathione S-transferase* e o perfil de segurança terapêutica à isoniazida, serão estudados pacientes com tuberculose tratados com o esquema terapêutico I (Ministério da Saúde). A segurança terapêutica será avaliada durante o tratamento. As variantes genéticas da NAT2, CYP2E1 e Glutathione S-transferase serão analisadas por PCR-RFLP, PCR multiplex e seqüenciamento de DNA. Também serão avaliados os efeitos adversos provocados pela terapia. Os resultados deste estudo contribuirão para o conhecimento do perfil de acetiladores da isoniazida na nossa população permitindo a adequação da terapia com isoniazida e a redução da incidência de efeitos adversos.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Integrantes: Francisco Jose Forestiero (Responsável); Rosilene F. Cardoso; Rosario D. C. Hirata; Mario H. Hirata; Fernando Fiuza de Melo

Financiador(es): FAPESP

2001 - 2002 **Análise de Mutações em genes relacionados com resistência à isoniazida em cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas em SP – Brasil**

A tuberculose é considerada uma das doenças infecciosas com maior índice de mortalidade no mundo. Nas últimas duas décadas houve um aumento significativo de casos da doença com a agravante da presença de cepas resistentes aos fármacos convencionalmente usados para o tratamento. Este fato tem levado muitos pesquisadores a estudar os mecanismos envolvidos no processo de resistência do *Mycobacterium tuberculosis*. Com o advento de técnicas em biologia molecular, estudos têm sido realizados no sentido de descrever mutações gênicas que podem estar associadas com o desenvolvimento de resistência em *M. tuberculosis*. No caso do fármaco isoniazida (H), estão descritas na literatura algumas mutações nos genes *katG*, *kasA*, *locus inhA*, e região intergênica *oxyR-ahpC* de *M. tuberculosis* associadas com resistência. Com base nessas informações, o presente trabalho pretende analisar a presença e a frequência de mutações específicas nesses genes e correlacioná-las com a concentração inibitória mínima (MIC) para H. Este estudo irá contribuir para o conhecimento das principais mutações associadas com resistência à H em *M. tuberculosis* isoladas em nossa região. O mesmo fornecerá subsídios importantes para futuros testes diagnósticos e de detecção de resistência em *M. tuberculosis*.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Integrantes: Leticia Cecon (Responsável); Francisco Jose Forestiero; Rosario D. C. Hirata; Mario H. Hirata

2001 – 2002 **Estudo do polimorfismo genético da apolipoproteína AI em indivíduos com hipercolesterolemia”**

A hipercolesterolemia é um distúrbio do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas que pode resultar em aumento da concentração do colesterol total, do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e redução do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C). A hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco da aterosclerose e das doenças cardiovasculares, que se constituem a principal causa de morte em muitos países. As mutações e polimorfismos de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas têm sido indicados como fatores importantes na predisposição às doenças cardiovasculares. As alterações genéticas da apolipoproteína AI (apo AI), principal apolipoproteína das HDL, têm sido associadas com variações na concentração plasmática de apo AI e HDL, e com a doença arterial coronariana. O objetivo deste trabalho é estudar a frequência relativa dos alelos dos polimorfismos da região promotora do gene da apo AI, assim como a sua associação com os valores séricos do colesterol total e suas frações.

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Microbiologia Aplicada
3. Farmácia

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SIMONE C. SORKIN, **FRANCISCO J. FORESTIERO**, MARIO H. HIRATA, ELIZABETH C. R. GUZMA ´N, SELMA A. CAVALLI, MARCELO C. BERTOLAMI, LUIS A. SALAZAR AND ROSARIO D. C. HIRATA. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. Clin Chem Lab Med 2005;43(12):1339–1345

Palavras-chave: apolipoprotein A-I; atorvastatin; gene polymorphism

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

2. CARDOSO, Rosilene F, COOKSEY, Robert C, MORLOCK, Glenn P, BARCO, Patricia, CECON, L., **FORESTIERO, Francisco J**, LEITE, Clarice Q F, SATO, Daisy N, SHIKAMA, Maria de Lourdes, MAMISUKA, Elsa M, HIRATA, Roasrio D C, HIRATA, Mario H
Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates obtained in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.48, p.3373 - 3381, 2004.

Palavras-chave: Tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, isoniazid resistance

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CECON, L., **FORESTIERO, F. J.**, Carbone, P.H.L, OLIVEIRA, D., MELO, F F, LEITE, Clarice Q F, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Mutations in KatG, inhA, kasA and oxyR-ahpC intergenic region of isoniazid-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis In: 24o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.
24o Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2007.
2. **FORESTIERO, F. J.**, CECON, L., MELO, F F, HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C.
Variantes da Glutathione S-transferase estão associados com eventos adversos durante o tratamento de pacientes com tuberculose In: 34o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2007, Belo Horizonte.
Revista Brasileira de Análises Clínicas. , 2007. v.39. p.38B
3. **FORESTIERO, F. J.** Effects of G-75A Polymorphism of the APOA1 gene on serum lipids in female hypercholesterolemic individuals. In: 15 IFcc - FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2003, Barcelona. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2003. v. 41.
4. SORKIN, Simone Cohen ; **FORESTIERO, F. J.** ; HIRATA, M. H. ; HIRATA, Rosario Dc ; CAVALLI, Selma A . Efeito do Polimorfismo MSP I do Gene da Apolipoproteína AI sobre os lipídeos Séricos em Indivíduos com Hipercolesterolemia. In: 6 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial, 2002, São Paulo, 2002. v. 38. p. 52-52.
5. CARDOSO, R. F., BARCO, Patricia, CECON, L., **FORESTIERO, F. J.**, NAKAMURA, D. S., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Análise comparativa entre o grau de resistência à isoniazida e a presença de mutações no gene katG 315 em cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas no Estado de São Paulo In: X Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos / VIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos / II Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul, 2001, Florianópolis.
Caderno de resumos dos trabalhos científicos. , 2001. p.83 -
6. CARDOSO, R. F., MAMIZUKA, E. M., HIRATA, R. D. C., NAKAMURA, D. S., BARCO, Patricia, CECON, L., LEITE, C. Q., **FORESTIERO, F. J.**, HIRATA, M. H.
Low frequency of codon 463 mutation in the katG gene in Mycobacterium tuberculosis strains from São Paulo state In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu.
Caderno de resumos do Congresso. , 2001. p.439
7. CECON, L., CARDOSO, R. F., BARCO, Patricia, **FORESTIERO, F. J.**, HIRATA, R. D. C., NAKAMURA, D. S., SHIKAMA, Maria de Lourdes, HIRATA, M. H.
Triagem de mutações no gene kasA em cepas de Mycobacterium tuberculosis resistentes à isoniazida (INH) In: VI Semana de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2001, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2001. v.37. p.5

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster/Painel no **24o Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Brasília, 2007. (Congresso)
Mutations in katG, inhA, kasA and oxyR-ahpC intergenic region of isoniazid-resistant isolates of mycobacterium tuberculosis.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **34o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**, Belo Horizonte, 2007. (Congresso)
Variantes da glutathione S-transferase estão associados com eventos adversos durante o tratamento de pacientes com tuberculose.
3. Participação no **I Curso Teórico de Atualização em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico** – São Paulo, 2006. (Curso)
4. Participação no **V Encontro Nacional de Profissionais em Pesquisa Clínica**, São Paulo, 2004.

(Encontro)

5. Participação no **Curso Introdutório para Monitores de Pesquisa Clínica**, São Paulo, 2003. (Curso)

6. Participação no **IV Encontro Nacional de Profissionais em Pesquisa Clínica**, São Paulo, 2003. (Encontro)

7. Participação no **I Curso Interno de Biologia Molecular**, São Paulo, 2002. (Curso)

8. Apresentação de Poster / Paineis no **X Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos**, Florianópolis, 2001. (Congresso)

9. Participação no **II Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, São Paulo, 2001. (Simpósio)

10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VI Semana de Ciência e Tecnologia da FCF-USP**, São Paulo, 2001. (Encontro)

Palavras-chave: Tuberculose, gene kasA, Resistência

Áreas do conhecimento : Microbiologia Aplicada, Biologia Molecular

11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001. (Congresso)

Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis, PCR-SSCP, Resistência, Isoniazida, Mutações

Áreas do conhecimento : Microbiologia, Biologia Molecular

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico..... 2

Trabalhos publicados em anais de eventos..... 7

Eventos

Participações em eventos (congresso)..... 3

Participações em eventos (simpósio)..... 2

Participações em eventos (encontro)..... 2

Participações em eventos (outra)..... 4