

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS PRESENTES  
NO GENE QUE CODIFICA  
N-ACETILTRANSFERASE 2 E ASSOCIAÇÃO COM  
HEPATOTOXICIDADE EM PACIENTES COM TUBERCULOSE  
TRATADOS COM RHZ**

**LIA GONÇALVES POSSUELO**

**Porto Alegre, junho de 2008.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS PRESENTES  
NO GENE QUE CODIFICA  
N-ACETILTRANSFERASE 2 E ASSOCIAÇÃO COM  
HEPATOTOXICIDADE EM PACIENTES COM TUBERCULOSE  
TRATADOS COM RHZ**

**Lia Gonçalves Possuelo**

**Orientador: Dr. Arnaldo Zaha**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**Porto Alegre, junho de 2008.**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais que abdicaram de muitas coisas no decorrer de suas vidas para que eu pudesse estudar, e ao meu marido grande companheiro em todos os momentos.

# AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Zaha pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim desde o início da minha formação acadêmica. Obrigada pela confiança em deixar eu iniciar um projeto do zero, decidir o que fazer no começo, meio e fim de todo o meu doutorado... Muito obrigada por todos os ensinamentos e pelo grande exemplo de dignidade, inteligência e caráter.

À Dra. Maria Lucia Rossetti pela oportunidade e confiança, por acompanhar minha formação acadêmica sempre incentivando a realização dos trabalhos e vibrando com minhas conquistas.

Ao Dr. Pedro Picon: pelo exemplo de profissional que é, pela dedicação à tuberculose durante toda sua vida, pelos ensinamentos, por todas as discussões que me fizeram chorar, crescer e aprender muito. Obrigada por ensinar o que, hoje, sei sobre hepatotoxicidade!!!!

À professora Mara Hutz, que me ensinou *muuuuito* nos poucos encontros que tivemos!!!  
Pelo grande apoio na fase final .....

Um agradecimento especial para as colegas e grandes amigas Andréia Valim e Patrícia Cafrune. À Andréia pelos ensinamentos, pelas “oportunidades”, amizade e carinho durante esses anos. À Patrícia, agradeço às críticas, que me fizeram crescer muito, o bom humor, a amizade e *principalmente pelo companheirismo durante os dois anos de coletas diárias no Hospital Sanatório Partenon!!!!*

Taís e Andrezza!!! Minhas filhotas, muito obrigada pela dedicação, pela imensa ajuda nos experimentos e nas coletas de amostras e entrevistas com os pacientes!!!

À Tatiana Gregianini pelos empurrões... pelas conversas.. idéias..... por acreditar em mim e no trabalho!!!!

À Jussara Castelan e à equipe do Laboratório Exame pela realização das provas de função hepática. À Jussara especialmente pelo bom humor, incentivo e pelas belas discussões!!!!

As colegas do CDCT pela amizade, pelas conversas na sala do café, pelo agradável ambiente de trabalho.....

Aos colegas do Centro de Biotecnologia, do Laboratório do professor Arnaldo por terem me recebido tão bem, com tanto carinho!! Principalmente ao Fabiano e ao Martin que me ajudaram muito na realização dos seqüenciamentos!! Luluzinha e Martin: obrigada pelos “bocaditos” vindos diretamente do Uruguai, pelos almoços e também pela ajuda na solução de diversos problemas!!!

À equipe do ambulatório de Tisiologia do Hospital Sanatório Partenon pelos ensinamentos referentes à rotina de atendimento dos pacientes, pela ajuda no recrutamento dos pacientes, pelos divertidos cafés..... aos médicos Dr. Espina, Dra Carla e Dra Gisela especial agradecimento pelas tão esclarecedoras conversas durante os atendimentos...

Aos pacientes que participaram do estudo, sem ao menos entender corretamente o que iríamos investigar, mas que confiaram e se comprometeram...

Ao Sr. Anildo, o motoboy que vinha todos os dias de Novo Hamburgo buscar as amostras para levar para o Laboratório Exame, por todos os dias perguntar: “tem alguma coisa hoje?”

Ao pessoal da Seção de Virologia do IPB-LACEN pela realização de alguns testes para hepatite B e C.

À secretária do PPG: Bioquímica, Cléia pelo auxílio no decorrer do curso.

Agradeço também à Cibele, uma graaaande amiga que participou de todas as etapas da minha formação e sempre torceu muito por mim!!!!

Aos meus queridos pais Danilo e Susana pelo suporte durante a minha formação e principalmente pela confiança depositada em mim!! Amo vocês!!!!

Ao meu amado e único irmão Ivan, que no decorrer do doutorado me deu uma sobrinha linda (meu docinho!!!)!! Te amo de mais!!!

Ao meu namorado que virou marido durante este doutorado, companheiro desde os primórdios desta caminhada, obrigada por ter agüentado muitas noites somente “eu e o computador”.... Por ter aturado o estresse da finaleira.... Obrigada!! *Te amo demais!!!*

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e ao Ministério da Saúde, PADCT 06/2005 da FEPPS e Instituto do Milênio por custear este projeto.

À todas aquelas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação e na realização deste trabalho. *Obrigada!!!!*

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ALT</b>	Alanina transaminase
<b>AST</b>	Aspartato transaminase
<b>CAGE</b>	<i>Cut down</i> (diminuir), <i>annoyed</i> (aborrecer), <i>guilt</i> (culpa), <i>eye opening</i> (ao despertar)
<b>CDCT</b>	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DL</b>	Desequilíbrio de Ligação
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EMB</b>	Etambutol
<b>FEPPS</b>	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
<b>GST</b>	Glutathione S-transferase
<b>HAART</b>	<i>Highly active antiretroviral treatment</i>
<b>HCV</b>	Vírus da hepatite C
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HSP</b>	Hospital Sanatório Partenon
<b>INH</b>	Isoniazida
<b>IPB-LACEN</b>	Instituto de Pesquisas Biológicas- Laboratório Central do Rio Grande do Sul
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NAT2</b>	N-acetiltransferase 2
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCT</b>	Programa de Controle da Tuberculose
<b>PFH</b>	Provas de Função Hepática
<b>PZA</b>	Pirazinamida
<b>RMP</b>	Rifampicina
<b>SES/RS</b>	Secretaria Estadual da Saúde/Rio Grande do Sul
<b>SHM</b>	Esquema terapêutico que inclui estreptomicina, isoniazida e etambutol
<b>SINAN/MS</b>	Sistema Nacional de Agravos Notificados/Ministério da Saúde
<b>SM</b>	Estreptomicina
<b>SNP</b>	Polimorfismo de Base Única
<b>STH</b>	Esquema terapêutico que inclui estreptomicina, tiacetazona e isoniazida
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>UGT</b>	Bilirrubina glicuronil transferase
<b>ULN</b>	Limite Superior Normal
<b>VNTR</b>	Número variável de repetições em tandem

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa da incidência, prevalência e mortalidade por TB no ano de 2006 (WHO, 2008).....	4
Tabela 2: Efeitos adversos mais comuns causados pelos fármacos anti-TB.....	7
Tabela 3: Freqüência de hepatotoxicidade e fatores de risco entre pacientes ambulatoriais. Estudos recentemente publicados na literatura. ....	8
Tabela 4: Variantes farmacogenéticas significativamente associadas com resposta terapêutica e/ ou desenvolvimento de efeitos adversos. ....	13
Tabela 5: Alelos humanos de <i>NAT2</i> mais freqüentes e seus fenótipos associados.....	15
Tabela 6: Caracterização funcional dos polimorfismos encontrados no gene <i>NAT2</i> .....	16
Tabela 7: Freqüência alélica dos SNPs mais comuns presentes no gene humano <i>NAT2</i> em diferentes populações. ....	18
Tabela 8: Descrição dos casos de hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB. ....	48
Tabela 9: Análise do perfil de acetilação com relação ao desfecho do tratamento atual.....	49
Tabela 10: Estudos genotípicos para identificação de associação entre ADR/hepatotoxicidade com perfil de acetilação para <i>NAT2</i> . ....	56

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Fórmula estrutural da isoniazida.....	10
Figura 2: Rota metabólica sugerida para INH e os metabólitos gerados por NAT2, CYP2E1 e GSTM1.....	22
Figura 3: Número de casos incluídos no estudo durante o período de coleta. ....	33
Figura 4: Esquema do estudo prospectivo, duplo-cego, multicêntrico (IDANAT2) para avaliar o possível benefício do ajuste da dose terapêutica de INH de acordo com o genótipo NAT2.. ..	64

## **LISTA DE FLUXOGRAMAS**

Fluxograma 1: Logística operacional, Coleta e Análise de dados.....	30
Fluxograma 2: Genotipagem de <i>NAT2</i> e análise dos resultados. Legenda da figura: PCR para amplificação do gene <i>NAT2</i> . ....	31

## RESUMO

*Mycobacterium tuberculosis* é responsável por dois milhões de mortes e oito milhões de indivíduos infectados por ano. Com o aumento da incidência da tuberculose (TB) em todo o mundo, um grande número de pacientes está sob alto risco de desenvolver efeitos adversos graves quando tratados com fármacos anti-TB. Isoniazida (INH) é um dos fármacos anti-TB mais antigos e mais efetivos, entretanto é o principal indutor de hepatotoxicidade. INH é metabolizada no fígado principalmente pela enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2). Diferenças na toxicidade da INH foram atribuídas à variabilidade genética no gene que codifica NAT2. Os polimorfismos de *NAT2* são muito comuns na população humana, e, os indivíduos podem ser classificados com fenótipos de acetilação rápida e lenta. Acetiladores lentos apresentam uma incidência maior de hepatotoxicidade que os acetiladores rápidos. Acetiladores rápidos são mais suscetíveis a desenvolver falência terapêutica. Desta forma, os objetivos principais deste estudo foram: (a) verificar a frequência de polimorfismos de NAT2, (b) determinar o perfil de acetilação de NAT2 e sua relação com a incidência de reações adversas gastrointestinais e hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB e (c) determinar os fatores de risco clínicos para hepatotoxicidade em uma população do Sul do Brasil. Um estudo de coorte prospectivo foi realizado incluindo 254 pacientes com TB provenientes do ambulatório do Hospital Sanatório Partenon (Porto Alegre, Rio Grande do Sul) usando rifampicina (RMP), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA). Uma entrevista, termo de consentimento livre e esclarecido e a revisão dos prontuários médicos foram obtidos para cada paciente incluído no estudo. A genotipagem de *NAT2* foi realizada através da técnica de seqüenciamento direto. Os resultados obtidos foram analisados através de análises univariadas e regressão logística múltipla. Dos 254 pacientes analisados, 69 (27,2%) eram acetiladores lentos e 185 (72,8%) acetiladores rápidos. Sessenta e cinco (25,6%) pacientes eram HIV positivos. Trinta e três (13%) e 14 (5,5%) pacientes desenvolveram efeitos adversos gastrointestinais e hepatotoxicidade, respectivamente. Dos 14 pacientes com hepatotoxicidade, 9 (64,3%) eram acetiladores lentos e 5 (35,7%) acetiladores rápidos. Sexo, idade, infecção por HCV, abuso de álcool e os níveis de aminotransferases antes do início do tratamento não foram encontrados como fatores de risco para hepatotoxicidade. Entretanto, a análise da regressão logística múltipla mostrou que o perfil de acetilação lenta e infecção por HIV ( $p < 0.05$ ) foram fatores de risco independentes para hepatotoxicidade. Nossos achados demonstraram que pacientes com HIV positivo e perfil de acetilação lenta estão significativamente associados com um risco maior de desenvolvimento de hepatotoxicidade. A genotipagem de polimorfismos de *NAT2* pode ser uma ferramenta útil para prever hepatotoxicidade aos fármacos anti-TB nesta população.

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* is responsible for two million deaths and eight million newly infected patients per year. As its incidence increases world-wide, a greater number of patients may be at risk for severe adverse drug reactions when treated with antituberculosis chemotherapy. Isoniazid (INH) is one of the oldest, but still one of the most effective antituberculosis agents and it is also the main drug to induce hepatotoxicity. INH is metabolized in the liver mainly by *N*-acetyltransferase 2 (NAT2), and the differences in its toxicity were attributed to genetic variability in *NAT2* gene. The *NAT2* polymorphism is very common in the human population, and individuals can be classified into fast and slow acetylator phenotypes. Slow acetylators have a higher incidence of anti-TB drug-induced hepatitis than fast acetylators. Fast acetylators are more susceptible to develop therapeutic failure. In this way, the main objectives of this study were: (1) to verify the frequency of *NAT2* polymorphisms, (2) to determine the *NAT2* acetylation profile, the relation to the incidence of gastrointestinal adverse drug reactions and anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity, and (3) to determine the clinical risk factors for hepatotoxicity in a population from southern Brazil. A prospective cohort study including a total of 254 TB outpatients from Hospital Sanatorio Partenon (Porto Alegre, Rio Grande do Sul) using isoniazid (INH), rifampicin (RMP) and pirazinamide (PZA) was done. An interview, a written informed consent and a review of medical records were obtained from each patient included in this study. *NAT2* genotyping was performed by direct PCR sequencing. The results obtained were analyzed through the univariate analysis and multiple logistic regression. From 254 patients analyzed, 69 (27.2%) were slow and 185 (72.8%) fast acetylators. Sixty-five (25.6%) patients were HIV positive. Thirty-three (13%) and 14 (5.5%) patients developed gastrointestinal ADR and hepatotoxicity, respectively. From 14 hepatotoxicity patients, 9 (64.3%) were slow and 5 (35.7%) were fast acetylators. Sex, age, HCV infection, alcohol abuse, baseline aminotransferases were not found as risk factors for hepatotoxicity. However, logistic regression analysis showed that slow acetylator status and the presence of immunodeficiency virus (HIV) ( $p < 0.05$ ) were independent risk factors for hepatotoxicity. Our findings showed that HIV positive patients and bearing slow acetylation profile are significantly associated with a higher risk of developing hepatotoxicity. The genotyping of *NAT2* polymorphisms may be a useful tool in this setting for predicting hepatotoxicity by antituberculosis agents.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. TUBERCULOSE: MAGNITUDE DA DOENÇA .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. ESQUEMAS TERAPÊUTICOS E EFEITOS ADVERSOS AOS FÁRMACOS ANTI-TB.5	
1.1.2. FARMACOLOGIA DA ISONIAZIDA.....	9
<b>1.2. FARMACOGENÉTICA: ASPECTOS GERAIS.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. N-ACETILTRANSFERASE 2 (NAT2).....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. TUBERCULOSE E FARMACOGENÉTICA.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. FLUXOGRAMA 1 .....	30
3.2. FLUXOGRAMA 2 .....	31
3.3. DESCRIÇÃO DETALHADA DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	32
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. ARTIGO CIENTÍFICO .....	36
4.2. OUTROS RESULTADOS.....	46
4.2.1. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO.....	46
4.2.2. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES COM HEPATOTOXICIDADE.....	47
4.2.3. DESFECHO DO TRATAMENTO PRÉVIO E DO TRATAMENTO ATUAL VERSUS PERFIL DE ACETILAÇÃO .....	50
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>

<b>5.1. AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2. ANÁLISE DO PERFIL DE ACETILAÇÃO DE NAT2 E FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NAT2.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3. ANÁLISE DA TERAPIA UTILIZADA NOS CASOS DE HEPATOTOXICIDADE</b>	<b>59</b>
<b>5.4. SIGNIFICADO CLÍNICO DOS RESULTADOS EM FARMACOGENÉTICA .....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO 1 - Questionário epidemiológico .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 3- Pareceres dos comitês de ética em pesquisa da Escola de Saúde Pública e da FEPPS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO 4 - Seqüência nucleotídica do gene <i>NAT2</i> e localização dos primers utilizados</b>	<b>96</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. TUBERCULOSE: MAGNITUDE DA DOENÇA

A tuberculose (TB), conhecida há milhares de anos, continua sendo um relevante problema de saúde pública. É uma doença de distribuição universal que, até meados do século XX, constituía uma das principais causas de morte no mundo (Raviglione and O'Brien, 1998).

O bacilo da TB é transmitido de pessoa a pessoa e a principal porta de entrada do bacilo é a via respiratória. Os doentes com a forma pulmonar bacilífera, especialmente as cavitárias, constituem a principal fonte de disseminação da doença, pois eliminam gotículas ou partículas (núcleo de Wells) de até 5 µm de diâmetro, contendo de 1 a 3 bacilos, através da tosse e/ou do espirro. Um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, em um ano pode infectar de 10 a 15 pessoas. As gotículas são estáveis e, quando eliminadas, ficam em suspensão no ar por várias horas, podendo chegar aos alvéolos pulmonares onde se multiplicam. As gotículas maiores com quantidades maiores de bacilos não constituem fonte de infecção, porque logo se depositam no solo, não formando aerossóis e se forem inalados não conseguem chegar aos alvéolos, sendo carregados para a orofaringe, deglutidos e expectorados. Os bacilos depositados em mucosas intactas ou na pele não conseguem invadir o tecido (Bates, 1980).

O avanço mais importante no combate a TB ocorreu na década de 1940 com o surgimento de antibióticos e quimioterápicos, trazendo a cura nos anos seguintes. A estreptomicina (SM), introduzida em 1944, a isoniazida (INH) empregada a partir de 1952, a pirazinamida (PZA) em 1955 e a rifampicina (RMP) introduzida em 1966, foram fundamentais para isso. Em 1979 foi instituído no Brasil um esquema utilizando INH, RMP e PZA, esquema este que apresenta uma eficácia de quase 100% (Kritski *et al.*, 2005).

Com as melhorias das condições de vida nos países desenvolvidos e a instituição do tratamento quimioterápico, houve uma redução da morbidade e, principalmente, da

mortalidade por TB. Até a década de 80, tinha-se a expectativa da eliminação dessa enfermidade já considerada sob controle relativo nos países desenvolvidos. Contudo, o crescimento mundial da sua incidência levou, em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar essa doença em estado de emergência, alertando para a necessidade de maiores esforços no seu combate (WHO, 1994). Apesar dos procedimentos para seu controle, por parte dos Programas de Controle da Tuberculose (PCT) e dos regimes terapêuticos usados, existem problemas inerentes à doença que incluem o surgimento de cepas resistentes aos fármacos usados no tratamento, à alta correlação da incidência da doença em populações pobres e, mais recentemente, a imunodepressão causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), criando as condições ideais para a transformação da TB em uma doença oportunista (Kaufmann and Van Embden, 1993; Brasil, 2002).

Segundo a OMS, aproximadamente 1/3 da população mundial está infectada por *M. tuberculosis*. Em 2006 surgiram no mundo mais 9 milhões de casos novos de TB, com uma prevalência de mais de 14 milhões e quase 1,6 milhões de mortes. As maiores taxas de incidência e mortalidade, respectivamente, foram observadas na África: 343/100.000 e 74/100.000 habitantes (WHO, 2008).

Na tabela 1 podemos observar os dados de incidência, prevalência e mortalidade estimados em 2006 para as sete regiões determinadas pela OMS (WHO, 2008).

**Tabela 1: Estimativa da incidência, prevalência e mortalidade por TB no ano de 2006 (WHO, 2008).**

Região OMS	Incidência <sup>a</sup>				Prevalência <sup>a</sup>		Mortalidade	
	Todas as formas		Bacilífero		Nº em mil	Taxa <sup>b</sup>	Nº em mil	Taxa <sup>b</sup>
África	2.808	363	1.203	155	4.234	547	639	83
Américas	331	37	165	18	398	44	41	4,5
Mediterrâneo Oriental	570	105	256	47	826	152	108	20
Europa	433	49	194	22	478	54	62	7.0
Ásia Sudoriental	3.100	180	1.391	81	4.975	289	515	30
Pacífico Ocidental	1.915	109	860	49	3.513	199	291	17
Global	9.157	139	4.068	62	14.424	219	1.656	25

<sup>a</sup>Incidência: casos novos determinados em um período; prevalência: número de casos que existem na população em um dado momento. <sup>b</sup>Taxa por 100.000 habitantes. Modificado de WHO, 2008.

A identificação dos 22 países responsáveis por aproximadamente 80% da TB mundial em 2000 fez com que novas estratégias para o controle da doença fossem delineadas. Além disso, houve o comprometimento dos governantes destes países em considerar a TB como um alvo a ser combatido. Entre estes 22 países destacam-se Índia, China e Indonésia, que somam mais de 40% de todos os casos estimados para 2006. Entre os 15 países com maiores taxas de incidência estimada, 12 são Africanos, explicado parcialmente pelas altas taxas de co-infecção com HIV (WHO, 2008).

O Brasil ocupa o 16º lugar entre os 22 países que são responsáveis por 80% de todos os casos estimados de TB no mundo e, junto com o Peru, respondem por 50% dos casos de TB nas Américas (WHO, 2008). Segundo dados do Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN/MS), em 2005, foram notificados 95.812 casos novos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 43,8/100.000 habitantes, com uma taxa de mortalidade de 2,8 por 100.000 habitantes.

No Rio Grande do Sul, em 2006 foram notificados 5.176 novos casos de TB, com incidência de 47/100.000 habitantes. Em Porto Alegre, a capital do Rio Grande do Sul, a

incidência de TB é em torno de 112/100.000 habitantes, o que representa aproximadamente 1.300 novos casos por ano, sendo em torno de 26% destes pacientes co-infectados com o vírus HIV (SES-RS, 2007).

Apesar dos esforços empreendidos mundialmente, a TB constitui-se, ainda, uma importante ameaça para a saúde pública. Os avanços no seu conhecimento e na tecnologia disponível para controlá-la não tem sido suficientes para impactarem, significativamente, em sua morbi/mortalidade, principalmente, nos países em desenvolvimento.

### 1.1.1. ESQUEMAS TERAPÊUTICOS E EFEITOS ADVERSOS AOS FÁRMACOS ANTI-TB

As reações adversas a medicamentos constituem um problema importante na prática do profissional da área da saúde. Sabe-se que essas reações são causas de hospitalização, de aumento do tempo de permanência hospitalar e, até mesmo, de óbito. Além disso, elas afetam negativamente a qualidade de vida do paciente, influenciam na perda de confiança do paciente para com o médico, aumentam custos, podendo também atrasar os tratamentos (Classen *et al.* 1977; Oberg, 1999).

A OMS define reação adversa a medicamentos como: "qualquer efeito prejudicial ou indesejável, não intencional, que aparece após a administração de um medicamento em doses normalmente utilizadas no homem para a profilaxia, o diagnóstico e o tratamento de uma enfermidade" (Conti, 1979; Capella and Laporte, 1989; Bates *et al.*, 1995).

Uma meta-análise amplamente citada na literatura onde foram avaliados 39 estudos prospectivos em pacientes hospitalizados nos Estados Unidos estimou uma incidência de 6,7% de efeitos adversos graves (Lazarou *et al.*, 1998). Alguns estudos estimam que efeitos adversos são causadores de mais de 7% de todas as admissões hospitalares na Inglaterra e 13% de todas as admissões nas clínicas de medicina interna na Suíça (Ingelman-Sundberg, 2001).

No Brasil, o tratamento para TB é feito, obrigatoriamente, na rede pública de saúde e os medicamentos são fornecidos gratuitamente nas unidades de saúde. Em 1979, a Divisão

Nacional de Pneumologia Sanitária/Ministério da Saúde (DNPS/MS) normatizou para todo o país um PCT tendo como base fundamental o tratamento quimioterápico, com um esquema de primeira linha, chamado Esquema 1 (E-1) ou RHZ de curta duração: rifampicina (RMP), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) por dois meses, seguidos de RMP e INH por quatro meses. O E-1 é indicado para todas as formas de TB sem uso prévio de medicação e, para o retratamento, nos casos de recidiva depois de curados, desde que estes pacientes tenham tido alta por cura há mais de cinco anos (Brasil, 2002).

O tratamento utilizado para pacientes infectados pelo vírus HIV não difere daqueles preconizados para pacientes não infectados, sendo, portanto, recomendados os mesmos medicamentos e esquemas posológicos e a mesma duração. Deve ser dada prioridade a esquemas que contenham RMP, tanto pela eficácia quanto pela facilidade de administração, pois os esquemas alternativos são mais complexos (Kritski *et al.*, 2005), embora existam vários trabalhos a respeito de significativas interações entre rifampicina e inibidores de protease ou inibidores da transcriptase reversa entre outros fármacos (Aaron *et al.*, 2004; Saukkonen *et al.*, 2006).

Muitas das reações adversas aos tuberculostáticos podem comprometer o tratamento. Entre os pacientes tratados para TB ativa ocorre um aumento de efeitos colaterais quando são usados os fármacos de primeira linha (Zahrt, 2003), podendo levar a uma descontinuação da terapia (Yee *et al.*, 2003). Na tabela 2, estão apresentados os principais efeitos adversos devido ao uso de fármacos anti-TB.

A hepatotoxicidade pode aparecer em proporção variável dos casos, em virtude do efeito dos metabólitos da INH, que são hepatotóxicos e de outros fatores clínicos amplamente relacionados com o aumento da incidência de hepatotoxicidade por fármacos anti-TB (Tabela 3).

A literatura internacional registra proporções variadas de casos de hepatotoxicidade pelo esquema RHZ (Castelo *et al.*, 1989; Combs *et al.*, 1990; Saukkonen *et al.*, 2006). A incidência desta reação adversa está relacionada com a idade, sendo de 0,35% até os 35 anos, e atingindo os

3% em pacientes com idade acima de 50 anos. A frequência de hepatotoxicidade também é mais elevada nos alcoolistas, em mulheres, nos doentes com hepatopatia prévia, desnutrição, em pacientes que apresentem elevação de transaminases no soro antes do início do tratamento, uso concomitante de outros fármacos e alguns fatores genéticos (Picon *et al.*, 1993; Pande *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002; Fernandez-Villar *et al.*, 2004) (Tabela 3).

**Tabela 2: Efeitos adversos mais comuns causados pelos fármacos anti-TB.**

<b>Reação Adversa</b>	<b>Fármaco</b>
Irritação gástrica (náusea, vômito) e dor abdominal	RMP, INH, PZA
Artralgia ou artrite	INH, PZA
Neuropatia periférica (queimação das extremidades)	INH, EMB
Cefaléia, insônia, euforia, ansiedade, sonolência	INH
Suor e urina de cor laranja	RMP
Prurido cutâneo	RMP, INH
Hiperuricemia	PZA, EMB
Febre	RMP, INH
Exantemas	RMP, SM
Hipoacusia	SM
Vertigem e nistagmo	SM
Psicose, crise convulsiva, encefalopatia tóxica e coma	INH
Neurite óptica	EMB, INH
Hepatotoxicidade (vômitos, alteração das provas hepáticas, hepatite)	Todas as drogas
Trombocitopenia, leucopenia, eosinofilia, anemia hemolítica, agranulocitose, vasculite	RMP, INH
Nefrite intersticial	RMP

Tabela modificada de Brasil 2002. INH= isoniazida, RMP= rifampicina, PZA= pirazinamida, EMB=etambutol, SM= estreptomicina.

No Ambulatório de Tisiologia do Hospital Sanatório Partenon (HSP) de Porto Alegre, a hepatotoxicidade ocorre em cerca de 4% dos pacientes (Picon *et al.*, 2004). Entretanto, nas unidades de Internação do HSP, onde a frequência de pacientes em mau estado clínico (TB miliar, co-infecção TB/HIV, hepatite C e outras co-morbidades) é maior, a taxa de hepatotoxicidade é superior a 10%, com letalidade em torno de 6% (Picon *et al.*, 1993).

O diagnóstico de dano hepático causado por fármacos é frequentemente baseado em evidências clínicas e laboratoriais. A decisão pela suspensão do tratamento é feita pelo clínico que reconhece a possível relação entre o início do dano hepático com o período de introdução da terapia. A desaceleração das manifestações de dano hepático, subsequente à retirada do

medicamento, evidencia a relação entre o dano e o uso do fármaco. Estudos histológicos do tecido hepático permitem apenas reconhecer o tipo de dano, mas não sua origem (Maddrey, 2005).

**Tabela 3: Frequência de hepatotoxicidade e fatores de risco entre pacientes ambulatoriais. Estudos recentemente publicados na literatura.**

População	Esquema terapêutico	Incidência de Hepatotoxicidade	Fator de Risco encontrado	Ref
151 pacientes	RMP, INH, PZA, EMB	7,3%	HCV	Know <i>et al.</i> , 2007
50 pacientes	RMP, INH, PZA, EMB	8%	Idade, sexo (feminino), desnutrição	Shakya <i>et al.</i> , 2005
1149 pacientes	RMP, INH, PZA, EMB / RMP, INH, PZA, SM	2,4%	-----	Gulbay <i>et al.</i> , 2006
207 pacientes	RMP, INH, PZA, EMB	6.2%	HBV	Lee <i>et al.</i> , 2002
471 pacientes	RMP, INH, PZA	11,9%	Alteração de PFH	Fernandes-Villar <i>et al.</i> , 2004
430 pacientes	RMP, INH, PZA	3,0%	Sexo (feminino), HIV	Yee <i>et al.</i> , 2003
346 pacientes	RMP, INH, PZA, EMB /RMP, INH, PZA, SM	16,2%	Idade, álcool, TB miliar, HLA	Sharma <i>et al.</i> , 2002

RMP= rifampicina, INH= isoniazida, PZA= pirazinamida, EMB= etambutol, SM= estreptomicina; HBV= vírus da hepatite B; HCV= vírus da hepatite C; PFH= prova de função hepática; HLA= antígeno leucocitário humano; HIV= vírus da imunodeficiência humana.

Há relativamente poucos meios para se identificar doenças hepáticas agudas ou crônicas através de manifestações clínicas. Geralmente, os sinais e sintomas de danos hepáticos não são específicos e refletem mais a extensão da lesão do que da sua causa. Pequenas elevações nos níveis das aminotransferases séricas (AST e ALT), bilirrubinas e fosfatase alcalina não causam sintomatologia clínica (Maddrey, 2005).

Estão descritos na literatura diversos critérios utilizados para definir hepatotoxicidade induzida por fármacos. A *British Thoracic Society* sugere que quando houver um aumento de ALT acima de duas vezes os valores de referência, a medicação deverá ser retirada e reintroduzida seqüencialmente quando os parâmetros enzimáticos voltarem aos níveis normais (Benèchou, 1990; Saukkonen, 2006). Por outro lado, a *American Thoracic Society* recomenda a

retirada dos fármacos anti-TB quando os níveis de transaminases atingirem níveis iguais ou superiores a três vezes o limite superior de referência para pacientes com sintomas sugestivos de hepatotoxicidade como icterícia, anorexia, náuseas, vômitos ou dor abdominal (Yew and Leung, 2006). No consenso brasileiro de TB (Castelo-Filho *et al.*, 2004) o conceito de hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB foi o mesmo que o determinado pela *American Thoracic Society*. Também pode ser definida hepatotoxicidade baseada em valores de aminotransferases superiores a cinco vezes o valor normal referencial sem sintomatologia associada (Yee *et al.*, 2003).

A combinação de aumento da atividade sérica de AST e ALT, três vezes o limite superior ao considerado como referência e evidência clínica de icterícia, caracterizam pacientes com alto risco de desenvolver lesão hepática grave (Castillo *et al.*, 1981; Attri *et al.*, 2000, Castelo-Filho *et al.*, 2004, Maddrey, 2005). Sintomas associados com dano hepático induzido por fármacos usualmente são inespecíficos e incluem perda de apetite, fadiga e ocasionalmente desconforto abdominal.

Um dos mais importantes fatores que determinam a suscetibilidade hepática aos efeitos tóxicos das substâncias químicas é o seu relevante papel no metabolismo. Este deve gerar compostos mais hidrofílicos e, portanto, mais facilmente elimináveis pelo organismo, porém pode produzir produtos reativos que atuam sobre as células *in loco*, provocando o dano.

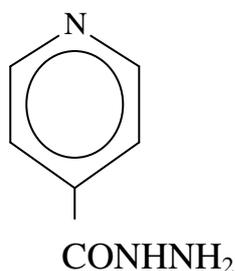
### 1.1.2. FARMACOLOGIA DA ISONIAZIDA

A INH é o fármaco de escolha para o tratamento e quimioprofilaxia porque, após três horas de sua administração, a concentração mínima inibitória no sangue para os bacilos da tuberculose é de 50 a 90 vezes maior que a necessária para matá-los. Além disso, ela tem forte poder bactericida associada à ação esterilizante. É o fármaco de menor custo dentre os utilizados no tratamento da TB (Brasil, 2002).

A INH entra na célula micobacteriana através de difusão passiva. É considerada uma pró-droga que, antes de exercer o efeito tóxico no bacilo, requer a ativação para uma forma

ativa. Sabe-se que a catalase-peroxidase bacteriana (KatG) é a enzima responsável pela sua ativação e gera radicais reativos que atacam vários alvos no *M. tuberculosis*. Evidências sugerem que o principal alvo deste fármaco é a inibição da biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular, fazendo com que a bactéria torne-se suscetível aos radicais de oxigênio e outros fatores do meio. O metabolismo normal de ácidos micólicos é crucial para a sobrevivência do *M. tuberculosis*, uma vez que são considerados os componentes chave da parede celular micobacteriana por formar uma barreira efetiva para a penetração de antibióticos. Além disso, pelo menos duas enzimas, também envolvidas na síntese do ácidos micólicos, a InhA (enoil-ACP redutase) e a KasA ( $\beta$ -cetoacil ACP sintetase), foram identificadas como alvos da INH (Lei *et al.* 2000).

A INH é rapidamente absorvida no intestino (Mariappan and Singh, 2003). O pico das concentrações plasmáticas desenvolve-se de 1 a 2 horas após a ingestão oral. Devido à variabilidade genética existente no metabolismo deste fármaco em seres humanos, as concentrações plasmáticas e sua meia-vida na circulação são significativamente alteradas. A meia-vida fica em torno de uma hora nos acetiladores rápidos e de três a cinco horas nos lentos, elevando-se ainda mais na presença de hepatopatias (Kalow and Spielberg, 1991).



**Figura 1: Fórmula estrutural da isoniazida**

A absorção e a biodisponibilidade são reduzidas quando a INH é administrada juntamente com alimentos (Self *et al.*, 1999; Goodman and Gilman 2004) e com antiácidos (Goodman and

Gilman 2004). A administração simultânea de ácido *p*-aminosalicílico produz altas concentrações de INH ativa livre no sangue, devido à redução do grau de acetilação.

A distribuição do fármaco ocorre amplamente nos diversos tecidos e fluidos corporais, incluindo o líquido cefalorraquidiano, onde forma níveis equivalentes a 20% daqueles presentes no sangue. Entre 75 e 95% da dose de INH é excretada na urina em 24h. As principais formas de excreção do produto no homem são acetilisoniazida (formada por acetilação) e ácido isonicotínico (hidrólise do produto). Pequenas quantidades de ácido isonicotínico conjugado, provavelmente isonicotinil glicina, uma ou mais moléculas de isonicotinil hidrazona e traços de N-metilisoniazida também são detectáveis na urina (Goodman and Gilman, 2004).

## **1.2. FARMACOGENÉTICA: ASPECTOS GERAIS**

A identificação de polimorfismos em genes que influenciam nas variações interindividuais, na eficácia ou toxicidade de agentes terapêuticos e a aplicação desta informação na prática clínica está sendo estudada pela farmacogenômica e/ou farmacogenética (Pang, 2003; Severino and Zompo, 2004; Tomalik-Scharte *et al.*, 2008).

Embora muitos fatores não genéticos influenciem o desenvolvimento de reações adversas aos medicamentos, tais como idade, etnia, terapia concomitante, interações medicamentosas e a natureza da doença, existem agora numerosos exemplos de casos nos quais diferenças individuais na resposta ao fármaco (eficácia e toxicidade) ocorrem devido a variações existentes na seqüência de DNA (polimorfismos) dos genes que codificam enzimas responsáveis pela biotransformação do fármaco, transportadores, e/ou polimorfismos nos próprios alvos do fármaco (receptores e enzimas) (Evans and Relling, 1999; Wilson *et al.*, 2001; Evans and McLeod, 2003; Pang, 2003; Brockmüller and Tzevetkov, 2008). Estima-se que a genética possa relatar de 20 a 95% da variabilidade da disposição e efeitos dos fármacos (Evans and McLeod, 2003).

Genes são considerados funcionalmente “polimórficos” quando variantes alélicas existem estavelmente na população, alterando a atividade da proteína codificada em relação à seqüência do tipo-selvagem. Em alguns casos, o polimorfismo genético está associado com a atividade reduzida da proteína codificada, mas existem também estudos demonstrando que a variante alélica codifica proteínas com atividade aumentada. Desde a clonagem e caracterização de CYP2D6 (Debrisoquina hidroxilase), outros genes humanos envolvidos em alguns traços farmacogenéticos estão sendo isolados, seus mecanismos moleculares estão sendo elucidados e sua importância clínica mais claramente definida (Tomalik-Scharte *et al.*, 2008).

Uma grande quantidade de variações genéticas humanas foram recentemente identificadas após a seqüência do genoma humano tornar-se disponível. Em geral dois tipos de variantes genéticas são descritas: polimorfismos e mutações. A maioria dos polimorfismos ocorre em nucleotídeos individuais, chamados *Single-Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Até o momento, aproximadamente 12 milhões de SNPs foram identificados no genoma humano (Redon *et al.*, 2006). Uma parte destes polimorfismos ocorre em regiões codificantes dos genes, que podem ou não mudar o aminoácido codificado, outros ocorrem em regiões não codificantes, mas podem modular a expressão de genes individuais (Roden *et al.*, 2001; Weinshilboum, 2003).

O exemplo de polimorfismo presente em genes que codificam proteínas relacionadas com resposta terapêutica bastante conhecido é o citocromo P450 (CYP450), uma família de proteínas muito semelhantes entre si. Pelo menos 50 diferentes enzimas humanas pertencentes ao CYP450, foram purificadas, clonadas, seqüenciadas e caracterizadas (Guengerich, 1995; Bondy and Zill, 2004;). O CYP450 é importante na hidroxilação de muitos fármacos diferentes, como os barbituratos e outros xenobióticos (substâncias que são estranhas ao organismo). A hidroxilação de compostos estranhos ao organismo transforma os mesmos em substâncias mais solúveis em água, o que permite sua eliminação na urina. Infelizmente, a hidroxilação de alguns compostos os converte em substâncias tóxicas, subvertendo o sistema de detoxificação (Lehninger *et al.*, 2000).

Na tabela 4, podemos observar algumas variantes farmacogenéticas atualmente estudadas que aparecem, significativamente, associadas com respostas terapêuticas e/ou com o desenvolvimento de efeitos adversos.

**Tabela 4: Variantes farmacogenéticas significativamente associadas com resposta terapêutica e/ ou desenvolvimento de efeitos adversos.**

Gene	Nome	Alelo	Fenótipo associado
<i>ALOX5</i>	5-lipooxigenase arachidonato	Promotor VNTR (wt=5; non-=3,4 ou 6)	Homozigotos mutantes têm reduzida resposta ao inibidor de 5-lipooxigenase.
<i>LIPC</i>	Lipase hepática	C514T	CC genótipo associado com a redução da resposta a estatinas.
<i>TPH 1</i>	Triptofano hidroxilase 1	A218C	Polimorfismo associado com resposta a antidepressivos. Tem resposta reduzida a omeprazol no tratamento de infecções por <i>Helicobacter pylori</i> .
<i>CYP2C19</i>	Citocromo P450 2C9	*2, *3	Alelos associados com sensibilidade a disquinesia em resposta a antipsicóticos
<i>CYP2D6</i>	Citocromo P450 2C9	*2, *3	Perfil de acetilação lenta de <i>NAT2</i> aumenta o risco de hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB
<i>NAT2</i>	N-acetiltransferase 2	Acetiladores Lentos incluem <i>NAT2*5B</i> , <i>NAT2*6A</i> , <i>NAT2*7A</i> ou <i>NAT2*14A</i> ou B	Variantes associadas com efeitos adversos em resposta a succinilcolina
<i>BCHE</i>	Butirilcolinesterase	Diversas mutações incluindo <i>ASP70Gly</i> e <i>Ala539Thr</i>	Variantes associadas com resposta ao irinotecan
<i>UGT1A1</i>	Uridina difosfato glicuronosiltransferase	*28,*6,*27	Variantes associadas com resposta a tiopurinas
<i>TMPT</i>	Tiopurina metiltransferase	*2,*3A,*3C	

Modificada a partir de Goldstein *et al.*, 2003. wt = tipo selvagem

### 1.3. N-ACETILTRANSFERASE 2 (NAT2)

A enzima N-acetiltransferase 2 humana, também conhecida como arilamina N-acetiltransferase 2 (NAT2) (E.C.2.1.3.5) é encontrada na fração solúvel dos hepatócitos humanos e também em outros tecidos, como a mucosa intestinal (Weber, 1999). Esta enzima catalisa a N-acetilação e O-acetilação de aminas aromáticas heterocíclicas. A expressão de polimorfismos na

enzima pode modificar o risco de câncer de bexiga, câncer de cólon e câncer de mama (Roberts-Thomson *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Schnakenberg *et al.*, 1998), também podem estar associados como fatores de risco para certas doenças como lupus eritematoso (Rychlik-Sych *et al.*, 2006), alergias e com reações adversas a diversos fármacos como isoniazida, procainamida, hidralazina, sulfametoxazol, dapsona entre outros (Kukongviriyapan *et al.*, 2003).

Desde a década de 1950 sabe-se que o gene que codifica NAT2 é polimórfico. A presença de polimorfismos em NAT2 confere aos indivíduos um perfil de acetilação rápida ou lenta. Diversos estudos de distribuição global referentes à frequência de polimorfismos do gene NAT2 foram realizados em dezenas de populações mundiais desde que o traço foi descoberto. A identificação do perfil de metabolização (acetilação) é considerada como um valioso fator prognóstico de susceptibilidade individual para um uso efetivo e seguro dos fármacos metabolizados por NAT2, assim como para o uso de compostos químicos com potencial carcinogênico (Weber, 1999).

O gene NAT2, está localizado no cromossomo 8 (mapa 8p22) e possui uma região codificante de 870 pb (Upton *et al.*, 2001). A capacidade de acetilação acelerada ocorre nos indivíduos com traço mendeliano dominante. A população em geral pode apresentar um perfil de acetilação rápida o que levaria ao metabolismo mais rápido dos fármacos ou, ao contrário, um perfil de acetilação lenta podendo, este, estar associado a um agravamento das reações adversas a medicamentos (Kalow and Spielberg, 1991; Gonzalez and Idle, 1994; Edwards, 1997).

As bases moleculares das variações individuais e interétnicas referentes à capacidade de acetilação são bem conhecidas (Upton *et al.*, 2001). Sete polimorfismos são comumente encontrados na região codificante do gene NAT2, quatro resultam em substituição de aminoácido que leva a uma redução significativa na capacidade de acetilação (substituições de base única nas posições G191A, T341C, G590A e G857A). Entre as demais mutações comumente encontradas, duas são mutações silenciosas (C282T, C481T), e uma substituição não-sinônima que não altera o fenótipo (A803G).

Na nomenclatura consenso do gene *NAT2* humano ([www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html](http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html)), onde se pode observar a classificação de todos os alelos atualmente conhecidos, grupos de SNPs localizados na região codificante são ligados em termos de haplótipos (Vatsis *et al.*, 1995; Hein *et al.*, 2000; Hein *et al.*, 2008). Cada combinação de SNPs constitui um distinto haplótipo que é tratado como um alelo do sistema haplotípico. Os alelos de *NAT2* descritos até o momento contêm até quatro das mutações conhecidas em diferentes combinações. Cada alelo está associado com um fenótipo de acetilação dependendo de quais mutações eles contêm (Tabela 5). A partir desta classificação, três fenótipos são descritos: a presença de dois alelos mutantes define o fenótipo de acetilação lenta; um alelo mutante e um alelo selvagem, acetilador intermediário; e dois alelos selvagens acetiladores rápidos. Entretanto, muitos pesquisadores definem as populações em apenas dois grupos, acetiladores lentos e rápidos (no grupo dos acetiladores rápidos são incluídos aqueles indivíduos que apresentam um ou dois alelos selvagens) (Sabbagh and Darlu, 2005).

*NAT2\*4* é o alelo selvagem, o qual apresenta a mais alta atividade enzimática comparada com os mutantes (*NAT2\*5*, *NAT2\*6* a *NAT2\*7*, *NAT2\*14*) (Bell, *et al.*, 1993). A atividade de acetilação *in vitro* é ranqueada como: *NAT2\*4* > *NAT2\*7* > *NAT2\*6* > *NAT2\*5* (Hein, *et al.*, 1995). Os alelos *NAT2\*12* e *NAT2\*13* não apresentam diferença na atividade de acetilação em relação ao alelo selvagem (Zang *et al.*, 2007).

**Tabela 5: Alelos humanos de *NAT2* mais freqüentes e seus fenótipos associados.**

Alelo	Alterações nucleotídicas							Fenótipo
	G191A rs1801279 <sup>+</sup>	C282T rs1041983 <sup>+</sup>	T341C rs1801280 <sup>+</sup>	C481T rs1799929 <sup>+</sup>	G590A rs1799930 <sup>+</sup>	A803G rs1208 <sup>+</sup>	G857A rs1799931 <sup>+</sup>	
<i>NAT2*4</i>								Rápido
<i>NAT2*5</i>			X					Lento
<i>NAT2*6</i>					X			Lento
<i>NAT2*7</i>							X	Lento
<i>NAT2*12</i>						X		Rápido
<i>NAT2*13</i>		X						Rápido
<i>NAT2*14</i>	X							Lento

Modificado de Sabbag and Darlu, 2005; <sup>+</sup>Identificação do SNP no NCBI

Zang *et al.* (2007) através da clonagem e expressão de aloenzimas recombinantes de *NAT2* em células de mamíferos, caracterizaram funcionalmente os SNPs e haplótipos de *NAT2* humano. Dentre os SNPs analisados, sete deles (G191A, T341C, G364A, A411T, G499A, G590A e G857A) reduziram a atividade de acetilação em vários pontos (Tabela 6). Embora os mecanismos sejam diferentes, cada um desses SNPs reduziu a atividade da proteína *NAT2*, consistente com o fenótipo de acetilação lenta. Os efeitos funcionais dos SNPs individuais não mudam quando analisadas as combinações haplotípicas.

**Tabela 6: Caracterização funcional dos polimorfismos encontrados no gene *NAT2*.**

SNP	AA	Caracterização funcional
G191A	R64Q	Redução da termoestabilidade e nível da proteína solúvel
G590A	R197Q	Redução da termoestabilidade e nível da proteína solúvel
T341C	I114T	Não reduz a termoestabilidade, aumenta a degradação da proteína
G857A	G286E	Substrato dependente e concentração dependente
G499A	E167K	Redução da atividade de acetilação
G364A	D122N	Redução da atividade de acetilação
A411T	L137F	Aumenta degradação protéica
C282T	-----	Sem efeito sobre os níveis de mRNA, proteína ou atividade catalítica para acetilação
C481T	-----	Sem efeito sobre os níveis de mRNA, proteína ou atividade catalítica para acetilação
A803G	K268R	Sem efeito sobre os níveis de mRNA, proteína ou atividade catalítica para acetilação

Zang *et al.* (2007) sugerem que G590A (R197Q) e G191A (R64Q) compartilham mecanismos comuns para o fenótipo de acetilação lenta. Estudos de mutagênese sítio direcionada e modelagem molecular sugeriram que R64 (Arg64) é estruturalmente importante. A interação entre R64 (Arg64) e E39 (Glu39) ajuda a manter a conformação ótima de C68 (Cys68) no sítio catalítico (Rodrigues-Lima and Dupret, 2002). Com relação ao polimorfismo G857A (G286E), a G286 (Gly286) está localizada na região C-terminal da proteína, a qual é altamente variável entre N-acetiltransferases de diferentes espécies. Uma substituição de aminoácido nesta região poderia influenciar a acessibilidade de alguns substratos, mas não de outros, levando a uma mudança de atividade substrato-dependente (Hickman *et al.*, 1995; Hein *et al.*, 2006). Estudos de cinética

demonstraram que G857A (G268E) reduzem o  $K_m$  para alguns substratos de N-acetilação, mas não para outros. Baseado nestes achados, o fenótipo do alelo *NAT2*\*7 poderia ser ambos, substrato dependente e concentração dependente.

Com relação aos SNPs G364A (D122N) e A411T (L137F), Zang *et al.* (2007) observaram a maior redução na atividade de acetilação entre todos os SNPs analisados. G364A (D122N) substitui o aspartato catalítico por uma asparagina, assim rompendo o núcleo catalítico e eliminando a atividade.

C282T e T341C não tem efeito sobre os níveis de mRNA de *NAT2*, proteína ou atividade catalítica (Zang *et al.*, 2007). O SNP C481T é frequentemente observado em desequilíbrio de ligação com o SNP T341C, por este motivo em muitos métodos de genotipagem, a enzima de restrição *KpnI* é frequentemente utilizada para detectar a presença do SNP C481T como alvo para identificar o SNP T341C.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o fenótipo de acetilação tem relação direta com a etnia (Blum *et al.*, 1990; Bell *et al.*, 1993; Attitallah *et al.*, 2000; Kita *et al.*, 2001; Vale *et al.*, 2003). Lin (1993) encontrou 4 mutações (G191A, C481T, G590A e G857A) que caracterizam o perfil de acetilação lenta na população negra, branca, asiática, hispânica. Na tabela 7, podemos observar as frequências dos principais SNPs de *NAT2* encontrados em diferentes populações mundiais. A distribuição étnica suportou uma interpretação que polimorfismos acetiladores existiam desde o período Paleolítico de populações humanas da África. Mais de 50% de indivíduos na população caucasiana podem ser identificados com fenótipo de acetiladores lentos (Blum *et al.*, 1990). Aparentemente, a capacidade de acetilação guarda relação inversa com a latitude no globo terrestre: acetiladores lentos estão em maior proporção entre os egípcios (92%), brancos e negros (50%) que habitam países próximos ao Equador, sendo menor a frequência entre os asiáticos (10%) e esquimós (5%).

**Tabela 7: Frequência alélica dos SNPs mais comuns presentes no gene humano NAT2 em diferentes populações.**

Referência	População	SNP(%)						
		191A	282T	341C	481T	590A	803G	857A
Sabbagh <i>et al.</i> , 2008	Senegal (194 alelos)	10	30	36	34	17	50	7,0
Teixeira <i>et al.</i> , 2007	Brasileiros (808 alelos)	4,1	36,8	37,7	35,4	26,4	40,3	4,5
Al-Yahyaee <i>et al.</i> , 2007	Sudaneses (254 alelos)	3,1	33,4	47,2	45,7	83,2	88,2	3,1
Bailliet <i>et al.</i> , 2007	Argentinos e Paraguaio (180 alelos)	nd	nd	nd	25	6,0	nd	20,1
Torkaman-Boutorabi, <i>et al.</i> , 2007	Iranianos (229 alelos)	nd	nd	31	nd	38	0,0	nd
Patin <i>et al.</i> , 2006	Africanos sub-saharianos (250 alelos)	8,0	11,3	24,6	23,3	22,5	27,5	4
Agundez <i>et al.</i> , 1994	Descendentes europeus (2068alelos)		25,8	45,9	45,6	26,4	47	1,2
Kukongviriyapan <i>et al.</i> , 2003	Tailandeses (470 alelos)	nd	47,4	nd	3,8	32,5	nd	20,4
Hamdy <i>et al.</i> , 2003	Egípcios (398 alelos)	nd	nd	49,7	nd	26	nd	28
Jorge-Nebert <i>et al.</i> , 2002	Ameríndios							
	Ngawbe (210 alelos)	nd	25,2	2,4	2,4	0,0	1,9	23,3
	Embera (882 alelos)	nd	29	9,9	9,2	3,7	9,9	22,8
Sekine <i>et al.</i> , 2001	Japoneses (96 alelos)	0	37,3	1,6	1,6	28,3	7,4	11,3
Xie <i>et al.</i> , 1997	Chineses (882 alelos)	nd	30,5	6,0	6,0	30,5	nd	11,2
Delomenie <i>et al.</i> , 1996	Africanos (234 alelos)	6,8	32,5	35,9	29,5	27,4	46,5	2,2
Cascorbi <i>et al.</i> , 1995	Alemães (1688 alelos)	0,1	30,8	46,5	42,5	27,8	42,4	1,3
Agundez <i>et al.</i> , 1994	Espanhóis (1008 alelos)	1,6	27,3	45	44,8	26	47,2	1,2
	Efeitos sobre atividade enzimática:	<b>Redução</b>	<b>Sem efeito</b>	<b>Redução</b>	<b>Sem efeito</b>	<b>Redução</b>	<b>Sem efeito</b>	<b>Redução</b>

nd : não determinado; SNP= polimorfismo de base única.

Estudos de epidemiologia molecular têm sido realizados para investigar a relação entre o perfil de acetilação de NAT2 e o risco individual para diversos tipos de câncer incluindo bexiga urinária (Gago-Dominguez *et al.*, 2003; Garcia-Closas *et al.*, 2005; Hein *et al.*, 2006), coloretal (Moslehi *et al.*, 2006; Ognjanovic *et al.*, 2006), mama (Deitz *et al.*, 2000; Sillanpaa *et al.*, 2005; Ambrosone *et al.*, 2008), próstata (Rovito *et al.*, 2005), pâncreas (Li *et al.*, 2006) e pulmão (Gemignani *et al.*, 2007). A maioria destes estudos não estabeleceu associações consistentes entre o perfil de acetilação e câncer. Entretanto, estudos utilizando métodos de genotipagem de NAT2 observaram associações com câncer de bexiga urinária que estão altamente associados com certos alelos de NAT2 que caracterizam perfil de acetilação lenta (Risch *et al.*, 1995;

Brockmöller *et al.*, 1996; Okkels *et al.*, 1997; Filiadis *et al.*, 1999), consistente com estudos prévios que utilizaram métodos fenotípicos (Cartwright *et al.*, 1982).

Em relação à tipagem de NAT2, Evans and White (1964) constataram que várias substâncias são acetiladas, no homem, pela mesma rota metabólica da INH, o que foi posteriormente confirmado por Peters e colaboradores. (1965). Desde então surgiram métodos de detecção de fenótipos baseados na eliminação da sulfametazina (uma destas substâncias acetiladas pela mesma rota da INH), cuja dosagem em fluidos orgânicos é mais fácil (Mattila *et al.*, 1969; Rao *et al.*, 1970).

Um dos métodos mais comumente utilizados na atualidade para fenotipagem de NAT2 é baseado na quantificação de metabólitos da cafeína na urina e o cálculo das taxas metabólicas é realizado após a ingestão de uma dose padrão de cafeína. Diversos autores demonstraram, utilizando cafeína, excelentes correlações entre o genótipo e o fenótipo de NAT2 (Cascorbi *et al.*, 1995).

Foi demonstrado que a genotipagem é melhor que a fenotipagem para detecção da hipersensibilidade a sulfametoxazol-trimetropin (Zielinska *et al.* 1998). Entretanto, é difícil comparar a acurácia entre diferentes métodos de fenotipagem de NAT2 ou entre diferentes pontos de corte usando o mesmo método de fenotipagem. A determinação do perfil de acetilação por genotipagem de NAT2 pode resolver este tipo de problema. Diversos trabalhos descrevem os resultados de comparações entre os métodos de fenotipagem e genotipagem para NAT2. Lee *et al.* (2002) investigaram a relação entre o genótipo de NAT2 caracterizado através do seqüenciamento do gene e o fenótipo através da análise dos metabólitos de INH. Relataram uma discordância de 0,9% entre os métodos utilizados. Os autores relatam a dificuldade de discernir acetiladores intermediários de acetiladores rápidos através da fenotipagem. Rihs e colaboradores (2007) avaliaram a concordância entre o genótipo de NAT2 deduzido por PCR em tempo real e o fenótipo de NAT2 por dosagem de metabólitos de cafeína. Os autores demonstraram uma

concordância de 100% entre os fenótipos de NAT2 e o genótipo deduzido por PCR em tempo real.

#### **1.4. TUBERCULOSE E FARMACOGENÉTICA**

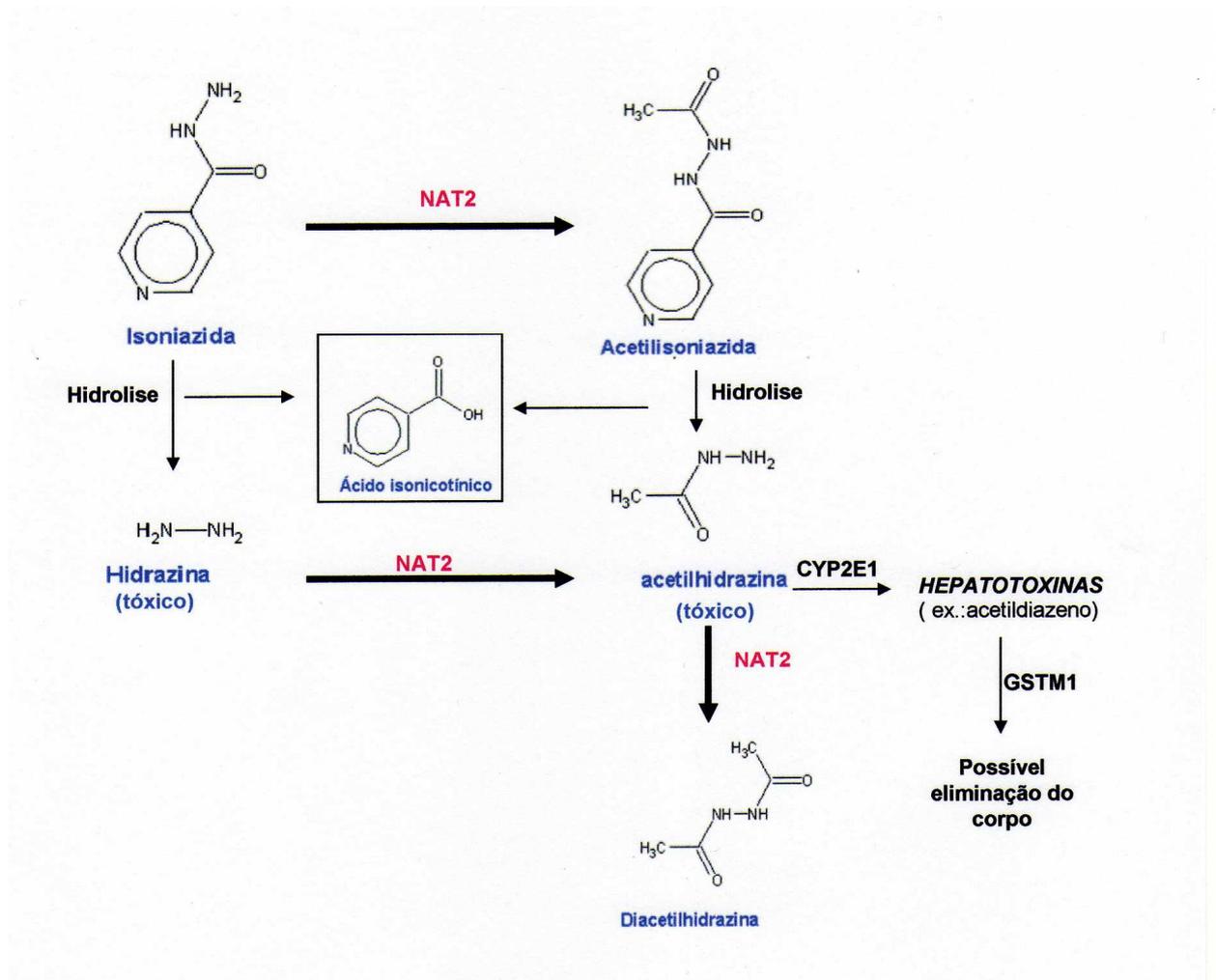
No Brasil, a estratégia de controle da TB é elaborada por programas governamentais, os quais consistem em diagnosticar e tratar os casos de TB o mais rapidamente possível, a fim de interromper a transmissão e de evitar a disseminação da doença. Atualmente, entre as medidas recomendadas pelo Ministério da Saúde, destacam-se a descoberta e tratamento de casos, o controle dos contatos, a vacinação com BCG (Bacilo Calmette-Guerin) e a quimioprofilaxia.

O aumento de indivíduos tratados leva, inevitavelmente, a um aumento de reações adversas aos fármacos utilizados. Dadas às características do *M. tuberculosis*, é necessário recorrer a um esquema de tratamento com múltiplos fármacos e por um longo período de tempo (igual ou superior a seis meses); estes fatores favorecem a possibilidade de desenvolvimento de reações adversas, que se registram entre 5% e 20% dos casos (Brasil, 2002).

No início da década de 50, a INH foi desenvolvida como agente quimioterápico para o tratamento da TB. Atualmente, é o principal fármaco utilizado no tratamento e profilaxia da doença. A INH é utilizada no tratamento da TB em conjunto com rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA), em um esquema conhecido como esquema de primeira linha ou RHZ de curta duração. A utilização deste esquema terapêutico em doses similares para todos os pacientes deu margem para a identificação de efeitos adversos sérios em alguns pacientes e em outros não. Desta forma, um melhor entendimento de como a INH é metabolizada pode ser de fundamental importância para que seja possível compreender os mecanismos pelos quais este fármaco gera hepatotoxicidade.

A enzima NAT2 é a principal responsável por metabolizar INH em humanos. Uma das vias de metabolização da INH (Figura 2) envolve sua acetilação através de NAT2 produzindo

acetilisoniazida (não tóxico) (Kashuba *et al.*, 1998). Esta, por sua vez, é hidrolisada formando acetilhidrazina (possivelmente tóxico) e subseqüentemente é acetilada por NAT2 formando o composto não tóxico diacetilhidrazina. Outra rota hipotética alternativa para a síntese de acetilhidrazina é a hidrólise da INH a hidrazina que pode ser acetilada a acetilhidrazina. Embora o mecanismo ainda não esteja bem elucidado, hidrazina tem se mostrado hepatotóxica em experimentos com animais (Garg and Tandon, 2003). Nelson e colaboradores (1976) demonstraram que CYP2E1 medeia a oxidação da monoacetil hidrazina podendo gerar metabólitos potencialmente hepatotóxicos como acetildiazeno, íon acetilium entre outros. Estas hepatotoxinas poderiam ser detoxificadas por GSTs presentes no fígado. Alternativamente, acetilhidrazina poderia também ser acetilada por NAT2 formando diacetilhidrazina (Lautenburg *et al.*, 1985). INH é também hidrolisada por uma hidrolase para formar ácido isonicotínico que pode ser conjugado com glicina e excretado pelos rins (Garg and Tandon, 2003). RMP é um potente indutor de CYP2E1, o que poderia estar relacionado com o aumento da atividade desta enzima e então regular a produção de agentes hepatotóxicos. Este poderia ser um dos possíveis mecanismos pelos quais a RMP aumenta a toxicidade da INH. Sugere-se que a INH seja convertida, rapidamente, em diacetilhidrazina e excretada do corpo em acetiladores rápidos, dessa forma acetiladores rápidos são menos susceptíveis ao desenvolvimento de hepatotoxicidade. Em indivíduos com perfil de acetilação lenta, menos acetilhidrazina é convertido em diacetilhidrazina e a maior parte da acetilhidrazina é oxidada por CYP2E1 para formar hepatotoxinas, além disso, devido à hidrólise direta de INH a acetilhidrazina, a maioria da INH pode ser convertida em hidrazina tóxica. Isto explicaria o motivo pelo qual pode ocorrer uma frequência maior de hepatotoxicidade entre os acetiladores lentos.



**Figura 2: Rota metabólica sugerida para INH e os metabólitos gerados por NAT2, CYP2E1 e GSTM1.**

Mitchell e colaboradores (1975) especularam que acetiladores rápidos são mais vulneráveis a desenvolver hepatite induzida por fármacos anti-TB, pois eles poderiam produzir hepatotoxinas mais rapidamente via acetilação rápida. No entanto, a disponibilidade de acetilhidrazina também depende da acetilação posterior pela mesma NAT2 para formar metabólitos não tóxicos, diacetilhidrazina. Em outros estudos, acetiladores lentos foram determinados como sendo mais vulneráveis a hepatotoxicidade que os rápidos (Ohno *et al.*, 2000; Hiratsuka *et al.*, 2002; Bozok-Cetintas *et al.*, 2008). Além disso, alguns autores, demonstraram a não associação entre o perfil de acetilação com o desenvolvimento de hepatotoxicidade (Gurumurthy *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1995; Vuillemeier *et al.*, 2006). As diferenças observadas entre os resultados de todos estes estudos indicam que é necessária uma melhor caracterização deste processo.

Alguns autores descreveram previamente que acetiladores rápidos poderiam tomar doses maiores de INH que acetiladores lentos. Baixos níveis plasmáticos do fármaco nos acetiladores rápidos são uma das razões para falência terapêutica (Ellard, 1976; Kita *et al.*, 2001; Hiratsuka *et al.*, 2002).

Grande parte dos casos de hepatite induzida por fármacos anti-TB têm sido atribuídos a INH. A INH é metabolizada no fígado por NAT2 e citocromo P450 2E1 (CYP2E1) para formar hepatotoxinas, como demonstrado na figura 1. CYP2E1 é constitutivamente expressa no fígado humano e está envolvida na bioativação metabólica de diversos carcinógenos e fármacos. Huang *et al.* (2003) avaliaram se o polimorfismo existente em CYP2E1 tem influência na susceptibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da TB, os quais sabidamente induzem hepatite. Foi observado que o polimorfismo genético existente em CYP2E1 deve estar associado com o desenvolvimento de hepatite em pacientes tratados com fármacos anti-TB (Huang *et al.*, 2003).

Kita *et al.* (2001) investigaram a relação entre o genótipo de *NAT2* e o fenótipo acetilador de INH em indivíduos saudáveis e pacientes com TB em tratamento com vários tipos de drogas e com diferentes estágios de doença renal e hepática. De acordo com os resultados obtidos através deste estudo, observaram que o método de genotipagem de *NAT2* é simples e rápido. Desta forma, os autores sugerem que este método poderia ser útil para monitoramento terapêutico e que o uso concomitante de diferentes fármacos não interfere no resultado da genotipagem.

Huang e colaboradores (2002, 2003) estudaram polimorfismos em *NAT2* e *CYP2E1* e identificaram que indivíduos com perfil de acetilação lenta e aqueles com genótipo c1/c1 para *CYP2E1* apresentavam alto risco para desenvolver hepatite induzida por fármacos anti-TB. Entretanto, a disposição dos fármacos é complexa e outros polimorfismos em genes candidatos à associação com hepatite foram analisados, entre eles os codificantes para a Manganês superóxido dismutase (MnSOD), enzima com papel crucial no estresse antioxidante, para NAD(P)H:quinona oxidoreductase (NQO1) e para Glutathione S-transferases (GST) M1 e T1. Os resultados deste estudo demonstraram que o alelo mutante C de MnSOD pode aumentar a suscetibilidade a hepatite induzida por fármacos assim como o genótipo GSTM1 nulo pode estar especificamente relacionado com hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB. GST é uma super-família de genes que codifica enzimas que catalisam a conjugação da glutathione em muitos eletrófilos incluindo óxidos areno, carbonilas insaturadas, haletos orgânicos, e muitos outros compostos químicos (Huang *et al.*, 2007). GST, como uma importante enzima de detoxificação de fase 2, foi correlacionada com a susceptibilidade de doença hepática alcoólica e muitos cânceres (Rothman *et al.*, 1993). Indivíduos com genótipo mutante nulo de GSTM1 ou GSTT1 têm uma perda da atividade enzimática. A presença da combinação do mutante nulo GSTM1 e T1 foi associada com dano hepático em pacientes em uso de tacrina e troglitazona. Entretanto, foi observado em alguns estudos que o genótipo homozigoto nulo GSTM1 predispõe a hepatite induzida por fármacos anti-TB (Roy *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2007).

## 1.5. JUSTIFICATIVA

Poucos estudos farmacogenéticos têm sido realizados em TB, dessa forma, devemos considerar a farmacogenética como um passo importante para tentar minimizar a toxicidade aos fármacos em função de determinantes herdados e relacionados a diferenças etno-raciais via manifestações fenotípicas, populacionais, geográficas ou sócio-culturais (Onho *et al.*, 2000;Vale *et al.*, 2003; Vuilleumier *et al.*, 2006).

Estudos genotípicos e fenotípicos referentes ao perfil de acetilação da população brasileira e associação do mesmo com resposta terapêutica ainda não foram realizados. Dessa forma, torna-se de grande importância esse tipo de estudo para que posteriormente seja possível a realização de ajustes de dose terapêutica com o intuito de reduzir os índices de reações adversas, visto que essas reações levam a um aumento significativo de hospitalização, aumentam custos, além de afetar negativamente a qualidade de vida do paciente. Outro ponto de grande importância de se avaliar é a falência terapêutica, uma vez que esta resposta poderia estar diretamente relacionada com o perfil de acetilação de NAT2.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo principal verificar a existência de associação entre o perfil de acetilação de *NAT2* e efeitos adversos gastrointestinais e/ou hepatotoxicidade entre os pacientes em tratamento para TB.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

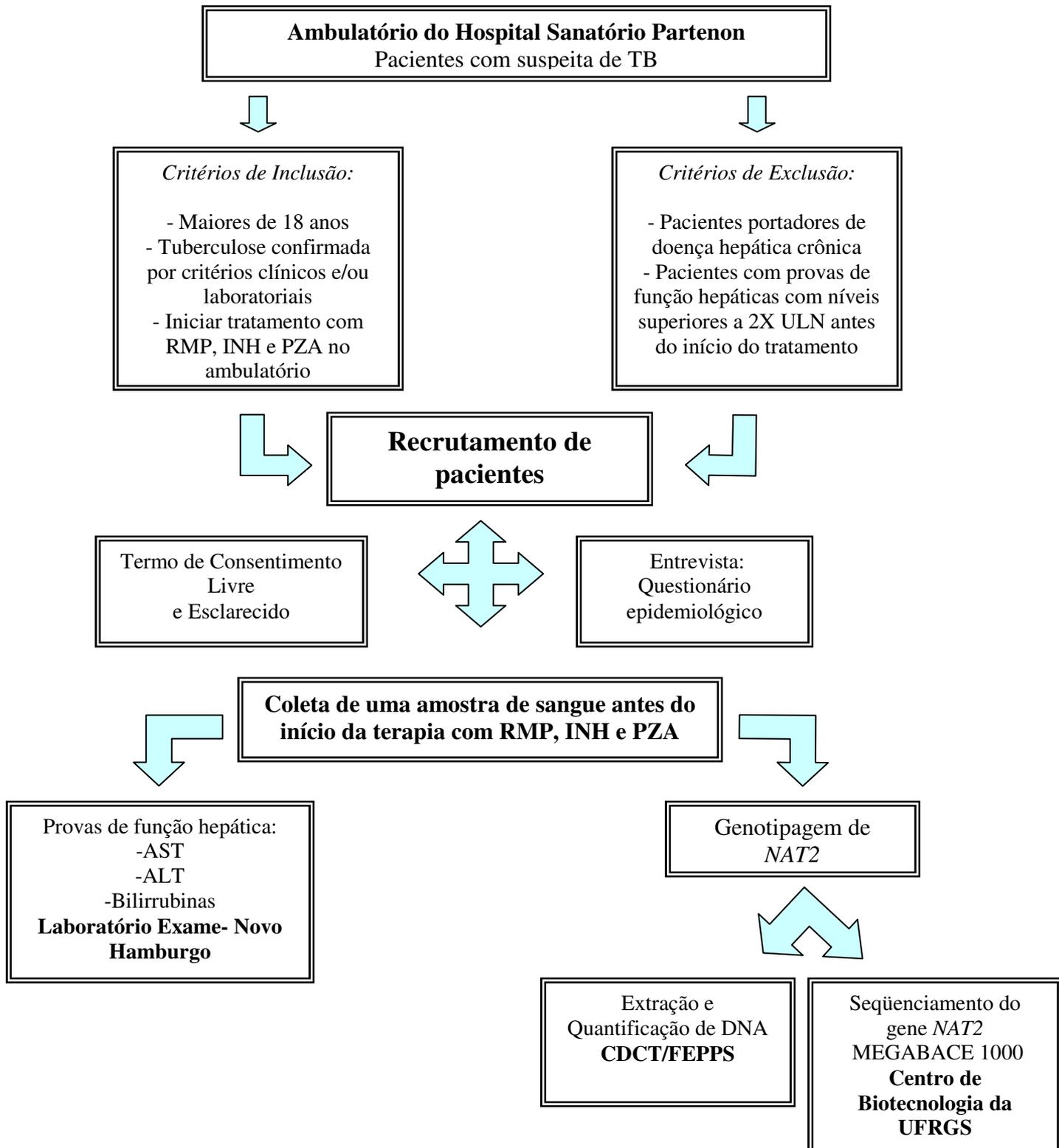
- a) Identificar fatores de risco clínicos para hepatotoxicidade na população estudada;
- b) Descrever a frequência de polimorfismos presentes no gene que codifica *NAT2*;
- c) Determinar a frequência de acetiladores lentos e rápidos através de seqüenciamento automático do gene que codifica a enzima *NAT2*;
- d) Verificar a existência de genótipos específicos de *NAT2* que possam estar relacionados com hepatotoxicidade;
- e) Avaliar o desfecho do tratamento *versus* perfil de acetilação;
- f) Identificar os esquemas terapêuticos utilizados em casos de hepatotoxicidade.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste item da presente tese, inicialmente, serão apresentados dois fluxogramas da logística operacional, coleta e análise de dados do estudo, e posteriormente uma descrição detalhada da população.

### 3.1. FLUXOGRAMA 1

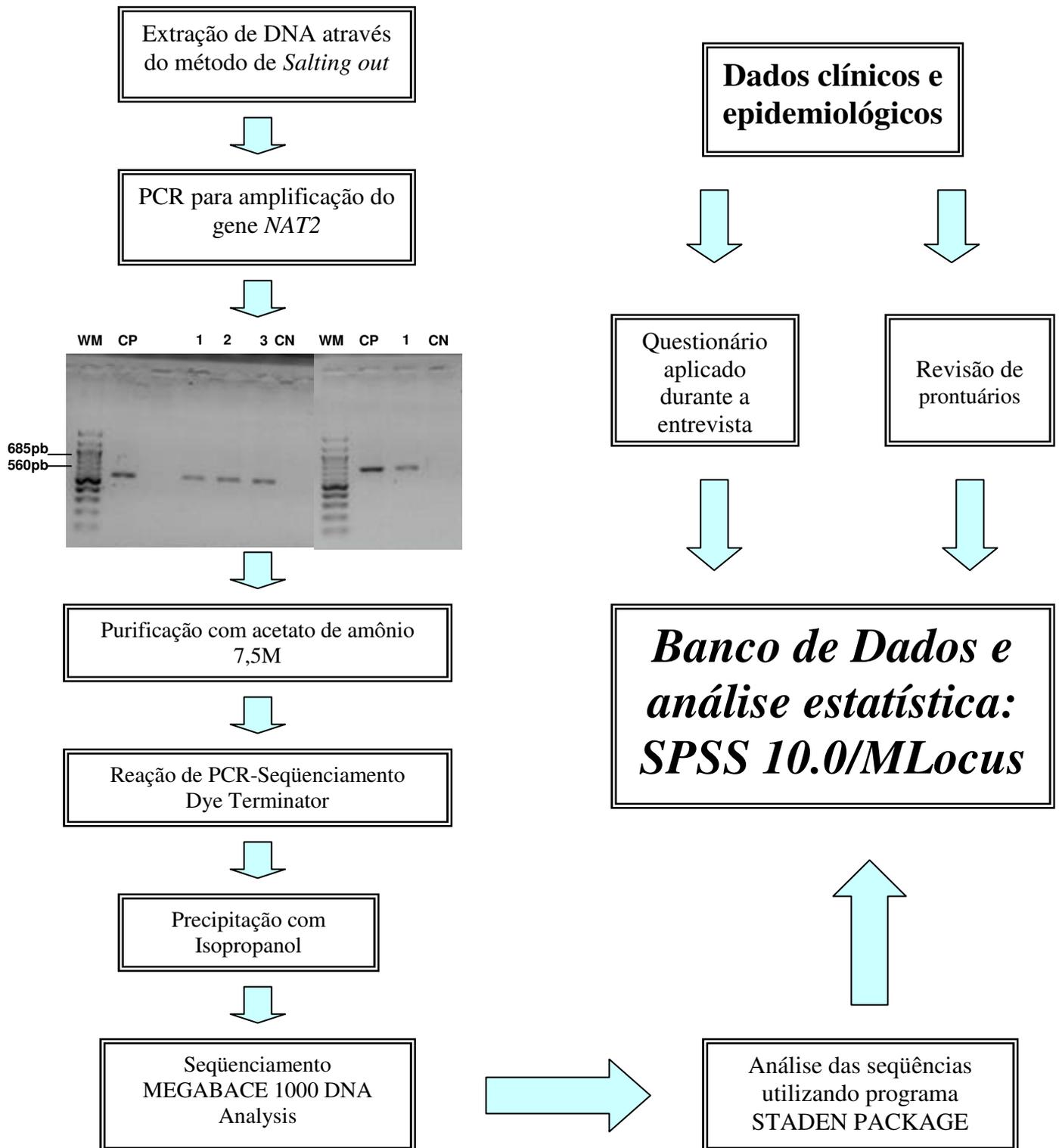
No fluxograma 1 será apresentado resumidamente a Logística Operacional, Coleta e Análise de Dados do estudo.



**Fluxograma 1: Logística Operacional, Coleta e Análise de dados.**

### 3.2. FLUXOGRAMA 2

Neste fluxograma será apresentado processamento detalhado das amostras para realização da genotipagem de *NAT2* e análise dos resultados.

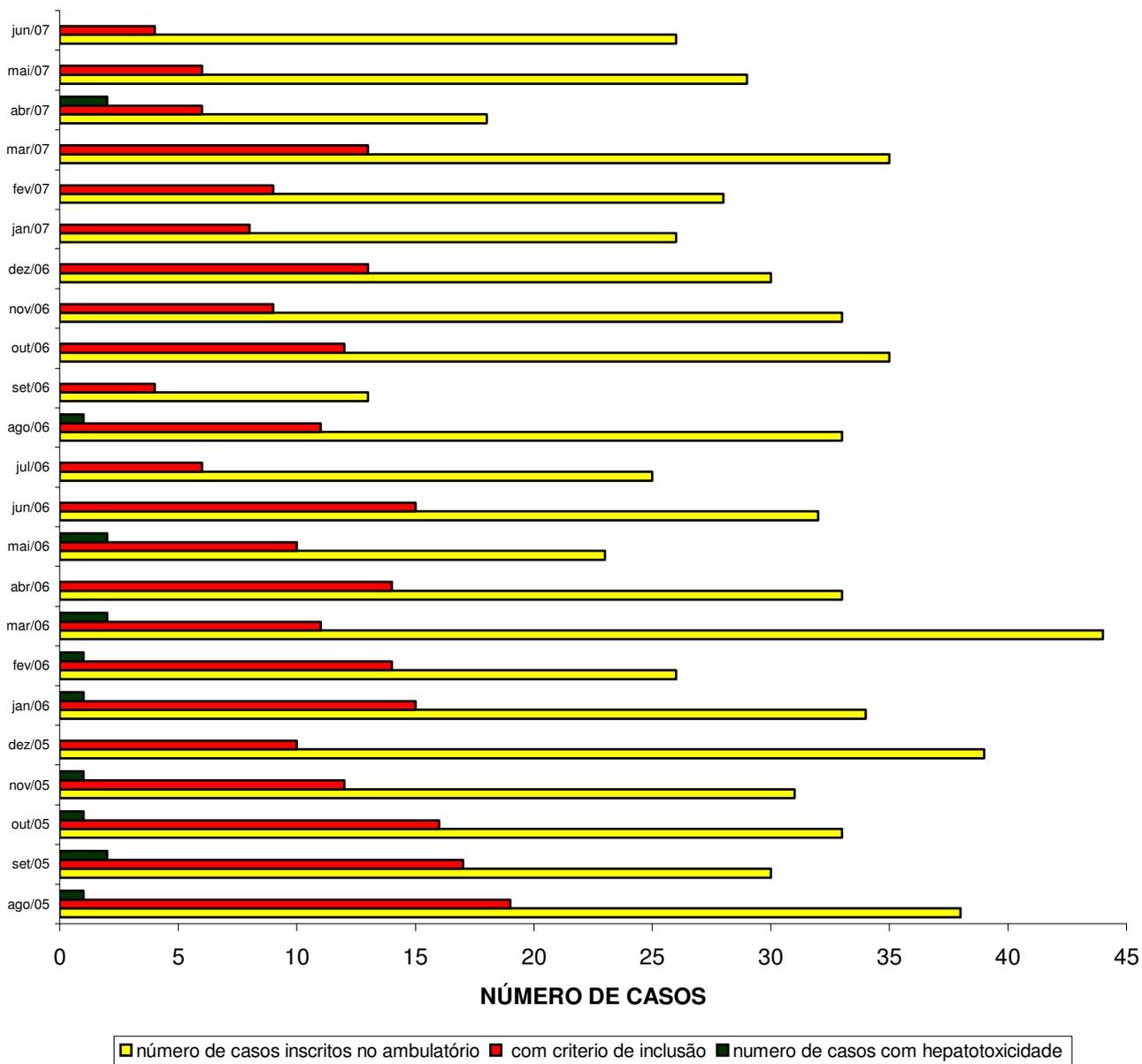


**Fluxograma 2: Genotipagem de *NAT2* e análise dos resultados. Legenda da figura: PCR para amplificação do gene *NAT2*. MW= marcador de peso molecular, CP= controle positivo, 1,2,3 = amostras, CN= controle negativo, pb= pares de base**

### **3.3. DESCRIÇÃO DETALHADA DA POPULAÇÃO ESTUDADA**

Um estudo de coorte prospectivo foi realizado. Foram incluídos pacientes admitidos consecutivamente para o tratamento de TB no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon (HSP), um hospital de referência para tratamento de TB, situado em Porto Alegre (Rio Grande do Sul, RS). Este ambulatório admite pacientes da área leste de Porto Alegre, representando em torno de 30% do total de casos novos notificados na cidade. Porto Alegre tem uma população de aproximadamente 1.360.590 habitantes. Os bairros da área leste da cidade, que conforme distribuição da Secretaria Municipal da Saúde, são de responsabilidade do HSP para atendimento em TB, são os seguintes: Agronomia, Lomba do Pinheiro, Partenon e bairros adjuntos, representando uma população de 180.000 habitantes.

De agosto de 2005 a junho de 2007 foram admitidos 669 pacientes para realizar tratamento para TB nesta unidade de saúde. Do total de pacientes inscritos no período do estudo, 254 (38%) preencheram os critérios de inclusão propostos em neste trabalho. Na figura 3 podemos verificar o número de pacientes atendidos neste ambulatório por mês, assim como os casos com critério de inclusão e os casos que desenvolveram hepatotoxicidade.



**Figura 3: Número de casos incluídos no estudo durante o período de coleta.**

## **4. RESULTADOS**

No item 4, estão descritos os principais resultados em forma de artigo científico e são relatados outros resultados não abordados no artigo científico.

## **4.1. ARTIGO CIENTÍFICO**

No subitem 4.1 estão descritos os principais resultados em forma de artigo científico publicado na revista *European Journal of Clinical Pharmacology* (DOI: 10.1007/s00228-008-0484-8).

## Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil

L. G. Possuelo · J. A. Castelan · T. C. de Brito ·  
A. W. Ribeiro · P. I. Cafrune · P. D. Picon ·  
A. R. Santos · R. L. F. Teixeira · T. S. Gregianini ·  
M. H. Hutz · M. L. R. Rossetti · A. Zaha

Received: 6 December 2007 / Accepted: 3 March 2008  
© Springer-Verlag 2008

### Abstract

**Purpose** To determine the frequency of N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) polymorphisms, the *NAT2* acetylation profile and its relation to the incidence of gastrointestinal adverse drug reactions (ADRs), anti-tuberculosis (TB) drug-induced hepatotoxicity, and the clinical risk factors for hepatotoxicity in a population from Brazil.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00228-008-0484-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. G. Possuelo · T. C. de Brito · A. W. Ribeiro · P. I. Cafrune ·  
T. S. Gregianini · M. L. R. Rossetti  
Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação  
Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde,  
5400, Avenida Ipiranga,  
Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil

L. G. Possuelo · P. I. Cafrune  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica,  
ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
2600, Ramiro Barcelos,  
Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

J. A. Castelan · M. L. R. Rossetti  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada,  
Universidade Luterana do Brasil,  
8001, Avenida Farroupilha,  
São José (Canoas), RS 92425-900, Brazil

J. A. Castelan  
Laboratório Exame,  
1040, Joaquim Nabuco,  
Novo Hamburgo, RS 93310-002, Brazil

P. D. Picon  
Hospital Sanatório Partenon,  
3722, Bento Gonçalves,  
Porto Alegre, RS 90650-001, Brazil

**Methods** Two hundred and fifty-four Brazilian TB patients using isoniazid (INH), rifampicin (RMP), and pirazinamide (PZA) were tested in a prospective cohort study. *NAT2* genotyping was performed by direct PCR sequencing. The association between gastrointestinal ADRs/hepatotoxicity and the *NAT2* profile genotype was evaluated by univariate analysis and multiple logistic regression.

A. R. Santos  
Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias,  
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, IOC/Fiocruz,  
4365, Avenida Brazil,  
Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil

R. L. F. Teixeira  
Laboratório de Genética Humana, Instituto Oswaldo Cruz,  
Fundação Oswaldo Cruz, IOC/Fiocruz,  
4365, Avenida Brazil,  
Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil

M. H. Hutz  
Departamento de Genética, IB,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
9500, Avenida Bento Gonçalves, Prédio 43323,  
Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

A. Zaha (✉)  
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, IB,  
and Centro de Biotecnologia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
9500, Avenida Bento Gonçalves, Prédio 43421,  
Porto Alegre, RS 91501-70, Brazil  
e-mail: zaha@cbiot.ufrgs.br

**Results** Of the 254 patients analyzed, 69 (27.2%) were slow acetylators and 185 (72.8%) were fast acetylators. Sixty-five (25.6%) patients were human immunodeficiency virus (HIV)-positive. Thirty-three (13%) and 14 (5.5%) patients developed gastrointestinal ADR and hepatotoxicity, respectively. Of the 14 hepatotoxicity patients, nine (64.3%) were slow acetylators and five (35.7%) were fast acetylators. Sex, age, presence of hepatitis C virus, alcohol abuse, and baseline aminotransferases were not found to be risk factors for hepatotoxicity. However, logistic regression analysis revealed that slow acetylator status and the presence of HIV ( $p < 0.05$ ) were independent risk factors for hepatotoxicity. **Conclusions** Our findings show that HIV-positive patients that have the slow acetylation profile are significantly associated with a higher risk of developing hepatotoxicity due to anti-TB drugs.

**Keywords** Genotyping · Hepatotoxicity · Isoniazid · N-acetyltransferase 2 · Tuberculosis

## Introduction

Throughout history, tuberculosis (TB) has assumed a prominent role as a disease that has affected society. The current most effective control is to cure the infection by treating the patient with anti-TB drugs. The three main drugs used to treat TB are isoniazid (INH), rifampin (RMP) and pyrazinamide (PZA), used in combination for 6 or more months [1]. These anti-TB drugs are also the principal responsible agents for a significant number of cases of hepatotoxicity, or potential cases, with INH being the main drug to induce these adverse drug reactions (ADRs) [1]. Hepatotoxicity caused by anti-TB drugs is associated with high morbidity and mortality as well as with increased costs during treatment [2, 3]. While the occurrence of drug-induced hepatotoxicity is difficult to predict, it has been observed that certain patients are at higher risk of developing drug-induced hepatotoxicity during the course of anti-TB chemotherapy than others. These include patients with pre-existing liver diseases, particularly those associated with chronic viral infection due to hepatitis B and C, immunodeficiency virus (HIV), sex (female), and advanced age [4–6].

Genetic factors have also been described as risk factors for hepatotoxicity [7–10]. The acetylation polymorphism was discovered over 50 years ago following differences being observed in TB patients in terms of INH toxicity [11]. These differences were subsequently attributed to genetic variability in N-acetyltransferase 2 (NAT2), a cytosolic phase II conjugation enzyme primarily responsible for the deactivation of INH [12, 13]. Genetic differences in N-acetylation capacity confer corresponding differences in the

biotransformation of INH. The classical N-acetylation polymorphism results from variant NAT2 alleles yielding fast and slow acetylator phenotypes [14]. The frequency of NAT2 alleles and acetylator phenotype varies remarkably with ethnic origin [15].

Earlier studies demonstrated an association between the NAT2 acetylation polymorphism and higher incidences and/or severity of ADRs to INH [7, 8, 10, 16, 17]. Although the acetylator status (fast or slow) of the individuals has been suspected as a potent risk factor for INH-induced hepatotoxicity, considerable controversy and uncertainty still exists given the wide variability of the results of these earlier studies [9, 14, 18–20].

The aim of the study reported here was to determine the frequency of the NAT2 polymorphisms, the NAT2 acetylation profile and its relation to the incidence of gastrointestinal ADRs and/or anti-TB drug-induced hepatotoxicity, and the clinical risk factors for hepatotoxicity through a prospective study of a population from Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil.

## Patients, materials and methods

The protocol used in the present study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Public Health, Rio Grande do Sul State (protocol number 156/05) and by the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde-FEPPS (protocol number 18/2006). All patients recruited in the present study provided an informed written consent.

### Study subjects

This was a prospective cohort study carried out between August 2005 and June 2007. A total of 254 unrelated patients with newly diagnosed TB from the outpatient section of Hospital Sanatório Partenon, a public TB reference hospital located in Porto Alegre, RS, were consecutively entered into the study. Inclusion criteria consisted of: adult patients (>18 years) who were newly diagnosed with active TB and who had been treated daily with INH, RMP, and PZA for the first 2 months followed by INH and RMP daily for 4 additional months, as recommended by the Brazilian National TB Program [1]. Drug dosages used were calculated according to patient's weight [21] (weight <45 kg: RMP 300 mg, INH 200 mg, PZA 1000 mg; 45–55 kg: RMP 450 mg, INH 300 mg, PZA 1500 mg; more than 55 kg: RMP 600 mg, INH 400 mg, PZA 2000 mg). Exclusion criteria were: patients presenting clinically and laboratory-confirmed liver chronic disease, patients using anti-TB drugs prior to enrollment in the study, patients presenting results of liver function tests prior

to the beginning of treatment higher than were twofold the upper normal limit and refusal to participate of the study.

The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and direct and total bilirubin were measured prior to anti-TB therapy, 30 and 60 days after the beginning of therapy or when the physician suspected hepatotoxicity. Serological testing for hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and HIV were also carried out prior to the initiation of anti-TB therapy. Clinical and epidemiological data, such as age, sex, skin color (self-reported), alcohol abuse (according to CAGE criteria [22]), and use of highly active antiretroviral therapy (HAART) or another co-medication, were collected using a standardized questionnaire at an interview and the review of medical records of each patient. Treatment adherence was evaluated by a pill count, regularity of attending medical appointments, and information obtained from medical records related to the regularity of pill taking.

#### Liver function tests and serology

Serum liver biochemical tests were measured using an automatic analyzer Dimension AR (DADE Behring, Germany) of the kinetic colorimetrics, and the upper limit normal (ULN) results were confirmed by the same method in Cobas Integra 400 Plus equipment (Roche, Germany). The comparison of liver functions tests were carried out by comparing the baseline levels (prior treatment) with the peak value (the highest level after commencing treatment). Hepatitis markers [hepatitis B surface antigen (HbsAg) and anti-HCV antibodies] and anti-HIV antibodies were analyzed using enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA) kits. All tests were carried out according to the manufacturer's protocols.

#### Gastrointestinal ADRs and definition of hepatotoxicity

Anorexy, nausea, vomiting, and/or abdominal pain were considered to be gastrointestinal ADRs. Criteria for the diagnosis of hepatotoxicity was an elevation in liver function tests, AST and/or ALT of more than threefold the ULN (reference: 40 and 65 U/L, respectively) and/or in total bilirubin up to >2.0 mg/dL in the presence of such gastrointestinal symptoms as anorexy, nausea, vomiting and/or jaundice, with a normalization of serum ALT level after discontinuation of the anti-TB drugs. These criteria are routinely used by pneumologists and gastroenterologists of HSP and are consistent with the recommendations of the Brazilian Tuberculosis Consensus [23]. Analysis of hepatotoxicity based on the criteria of the International Consensus meeting [24] (ALT of more than twofold the ULN) for drug-induced hepatotoxicity was also carried out.

Records of patients who developed hepatotoxicity were reviewed in detail in a search for risk factors as well as the subsequent consequences. In the group of patients with the diagnosis of hepatotoxicity, all drugs were withdrawn, and aminotransferases and bilirubin were measured weekly until they returned to normal levels. After the hepatotoxicity-related symptoms had disappeared and the liver function tests had returned to normal levels, anti-TB drugs were reintroduced in all patients studied. All patients who presented hepatotoxicity had their regimens modified as described in the Technical Recommendations of Tuberculosis Control Policy from Rio Grande do Sul State [21]; they received streptomycin (SM), INH, and ethambutol (EMB) for the first 3 months, followed by INH and EMB for an additional 9 months, after the liver function tests had returned to normal levels. None of the patients had a recurrence of hepatotoxicity after reintroduction of the anti-TB drug therapy.

#### NAT2 Genotyping method

A 5-mL volume of venous blood from each participant was collected in a tube containing EDTA. The leukocyte layer was separated by centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Genomic DNA was isolated from 500  $\mu\text{L}$  of the leukocyte layer using the salting out method [25]. After extraction, DNA samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until genotyping. The complete *NAT2* gene (870 bp) was amplified with primers NAT2-EF (5'-TTAGTCACACGAGGAAATCAAA-3') and NAT2-IR (5'-TGGTCCAGGTACCAGATTCC-3') and NAT2-IF (5'-ACCATTGACGGCAGGAATTA-3') and NAT2-ER (5'-AAATGCTGACATTTTATGGATGT-3'), resulting in two fragments. The first fragment is 560 bp long and contains part of the promoter region, starting 72 bp upstream of the start codon and ending at nucleotide 488 of the gene. The second (685 bp) starts at nucleotide 336 of the gene and ends 148 bp downstream of stop codon. The two primer sets used in the PCR analysis and/or for sequencing have been described by Teixeira et al. [26]. Amplification was performed in a thermocycler PTC 200 DNA Engine, (MJ Research, Waltham, MA) as follows: 20 pmol of each oligonucleotide, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.25 mM each dNTP, 5 U *Taq* polymerase (Cenbiot, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil), 10 mM Tris-Cl (pH 8.3), 50 mM KCl, 200 ng of genomic DNA in a 50  $\mu\text{L}$  reaction volume. Samples were incubated at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by 35 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min,  $54^{\circ}\text{C}$  for 1.5 min and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min, with a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min. The amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The PCR products were purified with 7.5 M ammonium acetate and used for direct sequencing. Sequencing was carried out on a MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Molecular Dy-

namics, Sunnyvale, CA) as recommended by the manufacturer. The obtained sequences were analyzed for the identification of single nucleotide polymorphism (SNP) by alignment with the reference sequence (GenBank accession X14672) using programs PREGAP and GAP4 from STADEN software package ver. 10.0. Nucleotide sequences with Phred values >20 were considered for analysis. The nomenclature of the *NAT2* genotype is given in accordance to that described in <http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>. The acetylator profile of *NAT2* was predicted according to the number of mutant alleles observed: presence of any two mutant alleles for *NAT2* variations 191A, 341C, 590A, and/or 857A was defined as a slow-acetylator profile, whereas a rapid acetylator presents one or two wild-type *NAT2*\*4 alleles. The physicians were not informed about the *NAT2* genotypes of their patients and applied treatment as usual.

#### Statistical analysis

Allele frequencies at individual SNPs were estimated by counting. The maximum likelihood estimate of haplotype frequencies and genotype with unknown phase was calculated with multiside marker data using the MULTIPLE LOCUS HAPLOTYPE ANALYSIS software program, ver. 2.0 [27–29]. Linkage disequilibrium (*D*) and *D'* (the relative magnitude of *D* as compared to its theoretical maximum) were calculated also using the software described above.

All statistical analyses were performed using the SPSS ver. 12.0 statistical program (SPSS, Chicago, IL) and EPIINFO ver. 6.04d (Centers for Disease and Control, Atlanta, GA). Values are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) or as numbers and percentages. Group comparisons for categorical variables were carried out using the  $\chi^2$  test, while Student's *t* test was used for the analysis of continuous variables. Odds ratios (OR) and confidence intervals (CI=95%) were also calculated. Multiple logistic regression analyses were carried out using the backward model. All statistical tests were based on a two-tailed probability, and a *p* value  $\leq$  0.05 was considered significant. The multivariate model was generated using variables with a *p* value > 0.20.

#### Results

The mean age of participating patients was  $36.5 \pm 12.2$  years (range 18–83 years). Of the 254 patients, 66.9% were male, 57% were white, and 25.6% were HIV-positive. Co-medication during the TB treatment was used by 102 patients (40.2%). Table 1 of the [Electronic Supplementary Material](#) summarizes the co-medication used by the patients

of this study. Of the 65 HIV-positive patients, 34 (52.3%) used co-medication, and five of these (7.7%) used sulfamethoxazole–trimetropin concomitant with anti-TB drugs. None of these patients developed hepatotoxicity. Of the 254 patients studied, 207 (81.5%) presented no ADR during anti-TB therapy. During the first 2 months of TB treatment, 33 (13%) patients presented a gastrointestinal ADR and 14 (5.5%) developed hepatotoxicity.

#### SNP frequency of the *NAT2* gene

Sequencing analysis of the 254 patients enrolled in the study showed that ten different SNPs were present in this population, seven of which have been described previously in other studies as being the most frequent in different ethnic groups. Distribution of the allele frequencies of the seven more frequent SNPs, their presumed influence on the protein sequence, and their possible association with the hepatotoxicity outcome are summarized in Table 1. Among the seven most frequent SNPs identified in the studied population, variant 803G was present at the highest frequency (64.5%), while variant 191A (cluster *NAT2*\*14) was the least frequent (1.4%). Three additional variants were found at frequencies lower than 0.4%: 345T, 578T, and 609T. The results of a linkage disequilibrium test carried out with the most frequently identified SNPs are shown in Table 2. The SNPs in the position 282T (cluster *NAT2*\*13), 341C (cluster *NAT2*\*5), 481T and 590A (cluster *NAT2*\*6) were found to be significantly associated with anti-TB drug hepatotoxicity (*p* < 0.05). No significant association was observed between the SNPs evaluated and the occurrence of gastrointestinal ADR patients.

#### Hepatotoxicity and *NAT2* genotype/ predicted phenotype

According to our classification, 69 (27.2%) and 185 (72.8%) patients were slow and fast acetylators, respectively. Genotype *NAT2*\*12/5 (31.4%), which contains polymorphisms 341C and 803G that are characteristic of the fast acetylator profile, was the most prevalent among the 19 different genotypes observed (Table 3).

Among the 14 patients with hepatotoxicity, nine (64.3%) were slow acetylators and five (35.7%) were fast acetylators, with only one patient (20%) presenting two alleles for fast acetylation. Figure 1 shows the relationship between the *NAT2* acetylator status and hepatotoxicity/gastrointestinal ADR patients. There was a noticeably significant association between the frequency of the slow acetylation profile and hepatotoxicity (*p* = 0.003; OR 5.5; CI 95% 1.6–19.8). Based on the criteria of the International Consensus, there was no observed significant association between hepatotoxicity and the acetylation profile in our patient cohort (*p* = 0.23).

**Table 1** Distribution of the frequencies of *NAT2* variants in relation to hepatotoxicity during anti-tuberculosis treatment

SNP	aa <sup>a</sup> change	Hepatotoxicity ( <i>n</i> )		Total <i>n</i> <sup>d</sup> (%)	Odds ratio <sup>e</sup> (95% CI)	<i>p</i> <sup>e</sup>
		No <sup>b</sup> (%)	Yes <sup>c</sup> (%)			
191A	R64Q	7 (1.5)	0 (0)	7 (1.5)	0.9 (0.91–0.97)	1.0
282T	None	141 (29.4)	18 (64.2)	159 (31.3)	4.3 (1.8–10.3)	<0.01
341C	I114T	160 (33.3)	16 (57.1)	176 (34.6)	2.7 (1.2–6.2)	<0.01
481T	None	136 (28.3)	11 (39.2)	147 (28.9)	4 (1.4–11.6)	<0.01
590A	R197Q	45 (9.4)	8 (28.6)	53 (10.4)	4 (1.5–10.4)	<0.01
803G	K268R	314 (65.4)	14 (50)	328 (64.5)	0.5 (1.2–1.2)	0.14
857A	G286E	10 (2.1)	1 (3.6)	11 (2.1)	1.7 (-)	0.46

SNP, Single nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup>aa, Amino acid change

<sup>b</sup>Frequency refers to 480 alleles

<sup>c</sup>Frequency refers to 28 alleles

<sup>d</sup>Frequency refers to 508 alleles

<sup>e</sup>*p* and odds ratio refer to a comparison of patients with and without hepatotoxicity

The *NAT2*\*6/6 genotype was significantly more frequent among patients that developed hepatotoxicity than among those without hepatotoxicity (OR 5.7; 95% CI 1.3–23) (Table 3). However, in gastrointestinal ADR patients, there was neither a significant association with the slow acetylation profile ( $p=0.69$ ) nor with a specific genotype.

#### Evaluation of clinical and genetic factors in relation to hepatotoxicity

Clinical, laboratory, and genetic information were analyzed. The mean age of patients who developed hepatotoxicity was  $38.9 \pm 12.8$  years (range 19–66 years); 50% were female, 57.1% were HIV positive, 15.4% were HCV positive, and six (42.9%) were taking co-medication. Age, sex, alcohol abuse, presence of HCV and/or HBV, use of co-medication (antiretroviral drugs and others), aminotransferases, and bilirubin baseline were not significantly different among patients with and without hepatotoxicity, neither were they significant among patients with the fast or slow acetylator profile. Human immunodeficiency virus-

positive and -negative patients also did not present any significant difference for the characteristics analyzed (data not shown).

In terms of hepatotoxicity, the HIV and slow acetylator profile were found to be risk factors ( $p < 0.01$ ) in this population. After logistic multiple regression, HIV and slow acetylation profile remained as independent risk factors of hepatotoxicity (Table 4).

In an attempt to eliminate the confounding effect of HIV on hepatotoxicity, we subsequently restricted the association analysis between hepatotoxicity and acetylation profile to the 181 HIV-negative patients in our sample. Fifty (27.6%) HIV-negative patients were slow acetylators and 131 (72.4%) were fast acetylators. Six (3.3%) of the 181 HIV-negative patients developed hepatotoxicity, of whom four (66.7%) were slow acetylators and two (33.3%) were fast acetylators (presenting one allele for slow acetylation) ( $p=0.05$ ; OR 5.6; 95% CI 0.8–45.8).

When acetylation profile was compared to skin color, among 145 white patients, 68.3% were fast acetylators and 31.7% were slow acetylators ( $p=0.04$ ). The skin color was

**Table 2** Pairwise LD values between the six polymorphisms in the coding region of *NAT2*

	<i>p</i> -values	282T	341C	481T	590A	803G	857A
D'							
282T			0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
341C		0.801		0.000	0.000	0.000	0.337
481T		0.880	0.946		0.000	0.000	0.486
590A		0.952	0.851	0.939		0.000	0.184
803G		0.428	0.881	0.902	0.852		0.009
857A		0.613	0.397	0.315	1.000	0.563	

Upward triangle is *p*-value and downward triangle is pairwise (D').

**Table 3** Genotype characterization of the *NAT2* gene and preliminary determination of acetylation profile in tuberculosis patients with and without hepatotoxicity

Genotype	Total <i>n</i> =254 (%) <sup>a</sup>	Hepatotoxicity		<i>p</i>	Odds ratio (95%CI)
		No: <i>n</i> =240 (%) <sup>a</sup>	Yes: <i>n</i> =14 (%) <sup>a</sup>		
No alleles for slow acetylation <sup>b</sup>	86 (33.8)	85 (35.4)	1 (7.1)	0.03	0.14 (0.01 – 1.05)
<i>NAT2</i> *4/4	18 (7.1)	18 (7.5)	0	–	
<i>NAT2</i> *4/12	1 (0.4)	1(0.4)	0	–	
<i>NAT2</i> *4/13	21 (8.2)	20 (8.3)	1 (7.1)	1.00	0.8 ( - )
<i>NAT2</i> *12/12	37 (14.5)	37 (15.4)	0	–	
<i>NAT2</i> *12/13	2 (0.8)	2 (0.8)	0	–	
<i>NAT2</i> *13/13	7 (2.8)	7 (2.9)	0	–	
One allele for slow acetylation <sup>b</sup>	99 (39)	95 (39.6)	4 (28.6)	0.58	0.6 (0.2 – 2.2)
<i>NAT2</i> *4/5	4 (1.6)	4 (1.7)	0	–	
<i>NAT2</i> *4/6	3 (1.2)	3 (1.2)	0	–	
<i>NAT2</i> *4/7	1 (0.4)	1(0.4)	0	–	
<i>NAT2</i> *4/14	4 (1.6)	4 (1.7)	0	–	
<i>NAT2</i> *12/5	80 (31.4)	76 (31.7)	4 (28.6)	1.00	0.9 (0.2 – 3.1)
<i>NAT2</i> *12/6	2 (0.8)	2 (0.8)	0	–	
<i>NAT2</i> *13/5	1 (0.4)	1(0.4)	0	–	
<i>NAT2</i> *14/12	4 (1.6)	4 (1.7)	0	–	
Two alleles for slow acetylation <sup>c</sup>	69(27.2)	60 (25)	9 (64.3)	<0.01	5.4 (1.57 – 19.4)
<i>NAT2</i> *5/5	33 (13)	31 (13)	2 (14.3)	0.7	1.1 (0.0 – 5.7)
<i>NAT2</i> *5/6	10 (3.9)	8 (3.3)	2 (14.3)	0.17	4.8 (0.6 – 29.3)
<i>NAT2</i> *5/7	3 (1.2)	2 (0.8)	1 (7.1)	0.39	9.1 (0.0 – 143.6)
<i>NAT2</i> *6/6	20 (7.9)	16 (6.7)	4 (28.6)	0.01	5.7 (1.3 – 23)
<i>NAT2</i> *7/7	3 (1.2)	3 (1.2)	0	–	

*NAT2*, N-acetyltransferase 2; CI, confidence interval.

<sup>a</sup> Percentages calculated according to the number of individuals analyzed in each group

<sup>b</sup> Fast acetylation phenotype

<sup>c</sup> Slow acetylation phenotype

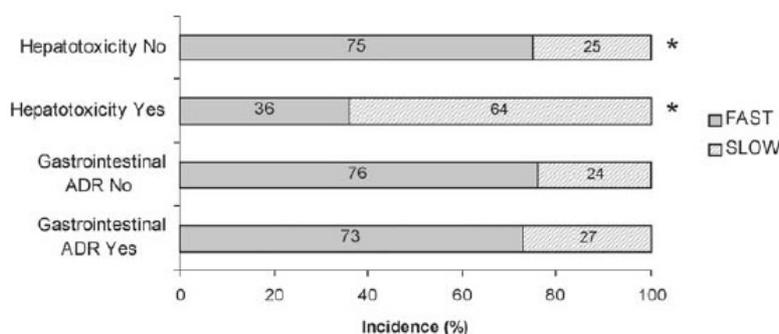
not significantly different between patients with and without hepatotoxicity ( $p=0.40$ ).

The effects of TB treatment on the levels of serum aminotransferases are shown in Table 5. During the peak, the serum levels of aminotransferases increased more than threefold ULN in 13% of the patients that presented two alleles for slow acetylation; this elevation was observed in only 0.5% of patients without slow alleles ( $p<0.05$ ). The elevated level of aminotransferases in patients that pre-

sented only one allele for slow acetylation was almost twofold higher than that in patients without alleles for slow acetylation, although the difference is not statistically significant (AST  $p=0.2$ ; ALT  $p=0.1$ ).

The mean dosage of RMP was  $9.2\pm 1.2$  mg/kg per day, INH,  $6.1\pm 0.8$  mg/kg per day, and PZA,  $23.7\pm 3.2$  mg/kg per day. These means were neither significantly different among fast and slow acetylators nor among patients with and without hepatotoxicity.

**Fig. 1** Relation between the *NAT2* predicted phenotype and the incidence of hepatotoxicity and gastrointestinal adverse drug reactions (ADR). \* $p<0.01$



**Table 4** Multivariate logistic regression analysis of risk factors associated with the development of hepatotoxicity

Characteristic	Univariate analysis: odds ratio (95% CI)	<i>p</i>	Multivariate analysis <sup>a</sup> : odds ratio (95% CI)	<i>p</i>
Alcohol abuse	0.8 (0.2–3.9)	0.6	–	–
Positive HCV	0.8 (0.2–3.7)	0.5	–	–
Positive HBV	6.0 (0.6–62.6)	0.2	–	–
Use of HAART	3.3 (0.9–13.1)	0.09	1.2 (0.2–6.2)	0.8
Positive HIV	4.0 (1.3–12.3)	0.007	4.6 (1.5–14.4)	0.009
Slow acetylator profile	5.5 (1.8–17.2)	0.003	5.5 (1.6–19.8)	0.001

HAART, Highly active antiretroviral therapy; HIV, human immunodeficiency virus; HC(B)V, hepatitis C(B) virus

<sup>a</sup>Results shown for the model selected through backwards elimination procedure

## Discussion

We have determined the frequency of the *NAT2* polymorphisms, the *NAT2* acetylation profile and its relation to the occurrence of gastrointestinal ADRs and anti-TB drug-induced hepatotoxicity, and the clinical risk factors for hepatotoxicity. Our major finding is the association of the slow acetylation profile with anti-TB drug-induced hepatotoxicity in a population of TB patients from Southern Brazil ( $p < 0.005$ ; OR 5.5; 95% CI 1.6–19.8), which is in accordance with results described by other researchers [7, 8, 10, 17]. The incidence of elevated levels of serum aminotransferase was significantly higher in slow acetylators than in fast acetylators ( $p < 0.05$ ). This finding is in accordance with that observed by Ohno et al. [7]. Some studies have found that fast acetylators were more susceptible to developing anti-TB drug hepatotoxicity [14], while other studies have reported an increased risk of drug-induced hepatotoxicity among slow acetylators [7, 8, 10]. Huang et al. [8] studied 224 patients, with an incidence of 6.3% of hepatotoxicity, and observed that, in comparison to fast acetylators, slow acetylators had a higher incidence of hepatotoxicity as well as being more prone to developing more serious liver injury [8]. In contrast, a number of other studies did not find any relationship between acetylator status and drug-induced hepatotoxicity [9, 19, 30]. Vuilleumier et al. [9] studied a population of 89 Caucasian patients using

only INH and did not observe a significant association between hepatotoxicity and the slow acetylation profile. This clear discrepancy among the results of previous studies on acetylation status and anti-TB hepatotoxicity may be due to the different designs of the studies, especially in terms of the methodology for *NAT2* typing [8, 14], the anti-TB drugs used [7–9], and the criteria for defining anti-TB drug hepatotoxicity. The *NAT2*\*6/6 genotype has also been found to be significantly associated with hepatotoxicity [8]. Higuchi et al. [10] studied 100 patients from Japan and reported that the *NAT2*\*6A allele as well as the *NAT2*\*6A/7B genotype were related to a higher incidence of hepatotoxicity. All of these findings support the hypothesis that the acetylation profile plays an important role in the pathogenesis of anti-TB drug-induced hepatotoxicity. Although many studies have described clinical aspects as risk factors for hepatotoxicity development [5, 31], INH and its metabolic intermediates have been indicated as a cause of hepatotoxicity [31]. Isoniazid is inactivated by *NAT2*, resulting in acetylisoniazid, which is hydrolyzed to acetylhydrazine. It has been proposed that acetylhydrazine is oxidized into hepatotoxic intermediates by cytochrome P4502E1 (CYP2E1). The other metabolic pathway to generate toxic intermediates is the direct hydrolysis of INH to hydrazine, a potent hepatotoxin [32]. Rifampin also induces hepatic amidase, which catabolizes acetylisoniazid into acetylhydrazine [33].

**Table 5** Effects of tuberculosis treatment on liver function test values during the trial

	Slow acetylators	Fast acetylators	
		One allele for fast acetylation	Two allele for fast acetylation
AST (U/L) baseline	26.4±14.2	29.1±21.4	27.8±18.4
ALT (U/L) baseline	31.8±21.9	29.4±20.8	28.8±19.8
Total (mg/dL) peak	0.4±0.2	0.4±0.3	0.4±0.3
AST (U/L) peak	62.3±85.6	60.9±125.2	33.3±38*
ALT (U/L) peak	107.3±170.3	86.3±138.7	47.5±78.5*
Total bilirubin (mg/dL) peak	0.5±0.4	0.5±0.9	0.4±0.7

\* $p < 0.05$  versus slow acetylators;

All values are expressed as mean ± SD.

AST, Aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; peak, the highest level after commencing the treatment

The frequency of the slow acetylator profile observed in our study was 27.2%, which is lower than that observed in many previous studies including well-characterized Caucasian populations where the slow acetylation profile observed was around 50% [34]. Teixeira et al. [26] studied 404 patients from two different populations from Brazil, one from Rio de Janeiro and another from Goiás. They predicted the NAT2 phenotype in 50% of the population studied, i.e. only in those homozygous for all SNPs found or heterozygous for only one SNP. Within the confines of this description, Teixeira et al. reported that 49% of patients were slow acetylators. The low frequency of the slow acetylation profile presented in our report could be related with the low frequency of SNP 590A (10.2%) (cluster NAT2\*6). The frequency of SNP 590A (27%) reported by Teixeira et al. [26] was significantly higher than that found in our study (10.4%) ( $p < 0.01$ ). The frequencies of other SNPs that characterize slow acetylation profile (341C and 857A) were not statistically different between our study and that conducted by Teixeira et al. [26]. The study carried out by Bailliet et al. [35] in which 90 individuals of different populations from Argentina and Paraguay were evaluated, identified as Amerindians on the basis of their geographic location, found that SNP 590A was present at a frequency of 9% only in Argentinean populations. The frequency observed in our study (10.4%) is similar to this value. Studies including European descendants reported the frequency of SNP 590A to be around 26% [34].

The Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world due to the ethnic admixture of people from three continents: the European colonizers, the African slaves, and the native Amerindians [36]. This admixture of ethnicities is spread throughout the country, with predominance of certain groups depending on the region [26]. Caucasian from the Azores Islands founded Porto Alegre in 1752, and at present this population still has many Portuguese descendants, but Italians, Spanish and Germans have also contributed to its gene pool [37] as have those of African descent. For this reason, the pharmacogenetics data obtained for the population described in our study cannot be compared to other Brazilian populations or with well-characterized Caucasian populations.

The incidence of anti-TB drug-induced hepatotoxicity in our study was 5.5%, and 64.3% of these patients were slow acetylators. Following logistic multiple regression analysis, HIV and the and slow acetylation profile remained as independent risk factors for hepatotoxicity. In contrast to other studies [7–9, 38], which were able to exclude patients with chronic viral infection (HCV and HIV) as well as alcohol abusers to avoid confusion, we were unable to exclude these patients due to the high incidence of these co-infections and of alcohol abuse in the study population (HCV 18.6%, HIV 26.4%, alcohol abuse 16.5%). In

addition, the treatment of patients with these characteristics is a daily routine in the outpatient clinic of Sanatório Partenon Hospital and in all TB outpatient clinics from Porto Alegre.

In summary, the data presented here describe the frequency of SNPs for NAT2 and the NAT2 acetylation profile in a Southern Brazilian population and, for the first time, provide evidence of an association between the NAT2 slow acetylation profile and hepatotoxicity due to anti-TB drugs in Brazilian patients. However, further prospective studies must be carried out to determine the NAT2 acetylation profile and its association with risk to anti-TB drug-induced hepatotoxicity in different Brazilian regions. Given the limitation of the low number cases of hepatotoxicity, additional multi-center studies with a higher number of hepatotoxicity cases will be needed to confirm these findings. Clinical trials could be carried out to evaluate the performance of genotyping test for NAT2 as routine tools in clinical practice to pre-screen patients at high risk for hepatotoxicity in this population.

**Acknowledgments** The authors wish to thank trial participants for their consent and participation in the study, and we also thank the staff of the outpatient Department and Research and Knowledge Department from Sanatório Partenon Hospital for their assistance. This work was supported by National Council for Research (CNPq), Laboratório Exame, Novo Hamburgo, RS, and PADCT/ FEPPS. Adalberto R. Santos is supported by CNPq Grant number 308786/2005-0. We declare that the experiments comply with the Brazilian current laws.

## References

1. Brasil (2002) Guia de Vigilância Epidemiológica, 1st edn. Fundação Nacional de Saúde/Funasa, Brasília
2. Ingelman-Sundberg M (2001) Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 250:186–200
3. Lundkvist J, Jonsson B (2004) Pharmacoeconomics of adverse drug reactions. *Fundam Clin Pharmacol* 18:275–280
4. Pande JN, Singh SP, Khilnani GC, Khilnani S, Tandon RK (1996) Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. *Thorax* 51:132–136
5. Ungo JR, Jones D, Ashkin D, Hollender ES, Bernstein D, Albanese AP, Pitchenik AE (1998) Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. The role of hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1871–1876
6. Yee D, Valiquette C, Pelletier M, Parisien I, Rocher I, Menzies D (2003) Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1472–1477
7. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto Y, Ogura T, Maeda K et al. (2000) Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 4:256–261
8. Huang YS, Chem HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY, Chang FY, Lee SD (2002) Polymorphism of the N-acetyltransferase 2

- gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 35:883–889
9. Vuilleumier N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, Memmillo B, Nicod L, Desmeules J, Hochstrasser D (2006) CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur J Clin Pharmacol* 62:423–429
  10. Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, Miyazaki Y et al. (2007) *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* 13:6003–6008
  11. Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schimdt LH (1954) Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc* 70:266–273
  12. Evans DAP, White TA (1964) Human acetylation polymorphism. *J Lab Clin Med* 63:394–401
  13. Weber WW, Hein DW (1979) Clinical Pharmacokinetics of isoniazid. *Clin Pharmacokinet* 4:401–422
  14. Mitchell JR, Thorgeisson UP, Black M et al. (1975) Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydralazine metabolites. *Clin Pharmacol Ther* 18:70–79
  15. Lin HJ, Han CH, Lin BK, Hardy S (1993) Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, Blacks, Hispanics and Whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet* 52:827–834
  16. Doll MA, Fretland AJ, Deitz AC, Hein DW (1995) Determination of human NAT2 acetylator genotype by restriction fragment length polymorphism and allele specific amplification. *Anal Biochem* 231:412–420
  17. Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CS, Nam MH, Kim JW, Lee SY (2007) Genetic polymorphisms of *NAT2* and *CYP2E1* associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 87:551–556
  18. Sarma GR, Immanuel C, Kailasan S, Narayana ASL, Venkatesan P (1986) Rifampin-induced release of hydrazine from isoniazid. A possible cause of hepatitis during treatment of tuberculosis with regimens containing isoniazid and rifampin. *Am Rev Respir Dis* 133:1072–1075
  19. Singh J, Garg PK, Thakur VS, Tandon RK (1995) Antitubercular treatment induced hepatotoxicity: does acetylator status matter? *Indian J Physiol Pharmacol* 39:43–46
  20. Parthasarathy R, Sarma GR, Janardhanam B, Ramachandran P, Santha T, Sivasubramanian S, Somasundaram PR, Tripathy SP (1986) Hepatic toxicity in South Indian patients during treatment of tuberculosis with short-course regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. *Tubercle* 67:99–108
  21. Secretaria Estadual da Saúde (2001) Norma Técnica da política de Controle da Tuberculose. Rio Grande do Sul, Porto Alegre
  22. Mayfield D, McLeod G, Hall P (1974) The CAGE questionnaire: validation of a new alcoholism screening instrument. *Am J Psychiatry* 131:1121
  23. Castelo Filho A, Kritski AL, Barreto AW, Lemos ACM, Neto AR, Guimarães CA, Silva CL (2004) II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *J Bras Pneumol* 30 Suppl 1
  24. Bénichou C (1990) Criteria of drug-induced liver disorders: report of an international consensus meeting. *J Hepatol* 11:272–276
  25. Muller AS, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
  26. Teixeira RL, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQ, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, Melo HM et al. (2007) Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutat Res* 624:31–40
  27. Long JC, Willians RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799–810
  28. Long JC (1999) MULTIPLE LOCUS HAPLOTYPE ANALYSIS, version 2.0. Software and documentation distributed by the autor. Section on population genetics and linkage. Laboratory of Neurogenetics (NIAAA), National Institute of Health, Bethesda
  29. Feterson RJ, Goldman G, Long JC (1999) Effects of worldwide population subdivision on ALDH2 linkage disequilibrium. *Genome Res* 9:844–852
  30. Gurumurthy P, Krishnamurthy MS, Nasareth O, Parthasarthy R, Samara GR, Somasundaram PR (1984) Lack of relationship between hepatotoxicity and acetylator phenotype in three thousand south Indian patients during treatment with isoniazid for tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 129:58–61
  31. Fernandez-Villar A, Sopena B, Fernandez-Villar J, Vazquez-Gallardo R, Ulloa F, Leiro V, Mosteiro M, Pineiro L (2004) The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:1499–1505
  32. Huang YS (2007) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3:1–8
  33. Thomas BH, Wong LT, Zeitz W, Solomonaj G (1981) Isoniazid metabolism in the rabbit, and the effect of rifampin pretreatment. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 33:235–247
  34. Agundez JAG, Martinez C, Oliveira M, Ledesma MC, Ladero JM, Benitez J (1994) Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population. *Clin Pharmacol Ther* 56:202–209
  35. Baillet G, Santos MR, Alfaro EL, Dipierri JE, Demarchi DA, Carnese FR, Bianchi NO (2007) Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. *Mutat Res* 627:171–177
  36. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:623–628
  37. Salzano FM, Freire-Maia N (1970) Problems in human biology. A study of Brazilian populations. Wayne State University Press, Detroit
  38. Hiratsuka M (2002) Development of simplified and rapid detection assay for genetic polymorphisms influencing drug response and its clinical applications. *Yakugaku Zasshi* 122:451–463

## 4.2. OUTROS RESULTADOS

### 4.2.1. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO

Duzentos e cinquenta e quatro pacientes foram elegíveis para este estudo. A média de idade foi  $36,5 \pm 12,2$  variando de 18 a 83 anos, incluindo dez pacientes com mais de 60 anos. Cento e setenta (66,9%) pacientes eram do sexo masculino, 144 (57,0%) eram brancos. Quarenta e dois (16,5%) pacientes eram usuários de álcool, conforme os critérios do CAGE, 56 (22%) apresentavam desnutrição. Duzentos e onze (83,1%) pacientes foram diagnosticados com TB pulmonar, 40 (15,7%) com TB extrapulmonar e outros três (1,2%) com TB miliar. Com relação ao HIV, 65 (25,6%) pacientes eram positivos, destes 21 (32,3%) usavam terapia antiretroviral, 20 (95,3%) pacientes estavam usando lamivudina, 14 (66,6%) efavirenz e 13 (61,9%) usavam estavudina.

Quando analisamos os resultados das provas de função hepática antes do início do tratamento, observamos que 36 (14,2%) pacientes tinham AST acima dos limites superiores normais, 19 (7,5%) tinham ALT alterada e três (1,2%) tinham bilirrubinas alteradas. Nenhuma dessas alterações foi superior a duas vezes o limite superior normal. Entre os pacientes que eram usuários de álcool 23,8% tinham provas de função hepática alteradas no início do tratamento e 22,7% dos pacientes HCV positivos tinham essas provas alteradas.

A dose média de RMP, INH e PZA em mg/kg/dia, foi  $9.2 \pm 1.2$  (5.2 - 13.5),  $6.1 \pm 0.8$  (3.5 - 8.9) e  $23.7 \pm 3.2$  (15.4 - 33.7), respectivamente.

#### 4.2.2. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES COM HEPATOTOXICIDADE

Os dados clínicos e demográficos de cada um dos pacientes que desenvolveu hepatotoxicidade estão apresentados na tabela 8. Com relação a tratamentos prévios, somente dois pacientes (14,3%) tiveram um episódio anterior de TB com alta por cura (paciente 1 e paciente 10).

O intervalo de tempo entre o início do tratamento até o desenvolvimento da hepatotoxicidade foi de 8 a 90 dias (mediana 14 dias) com 13 pacientes desenvolvendo hepatotoxicidade dentro do primeiro mês de tratamento (93%). O tempo de retirada dos fármacos até a resolução da hepatotoxicidade variou de 8-30 dias (mediana 12 dias).

Nenhum dos pacientes com hepatotoxicidade necessitou admissão hospitalar ou apresentou insuficiência hepática. Todos os pacientes tiveram seus regimes de tratamento modificados, receberam estreptomicina (SM), isoniazida (INH) e etambutol (EMB), esquema conhecido como SHM. Este é um esquema alternativo ao RHZ, utilizado no Rio Grande do Sul em casos de hepatotoxicidade. Nenhum paciente teve recorrência de hepatotoxicidade após a introdução do esquema alternativo. Com relação ao desfecho do tratamento com SHM, 12 (85,7%) pacientes obtiveram alta por cura, um paciente faleceu por motivos outros que a tuberculose e um abandonou o tratamento.

**Tabela 8: Descrição dos casos de hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB.**

<b>Caso</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tempo (dias)<sup>a</sup></b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Pico Bilirrubina (mg/dL)</b>	<b>Pico AST/ALT (U/L)</b>	<b>Fatores de Risco<sup>b</sup></b>	<b>NAT2 GENÓTIPO/ FENÓTIPO</b>
1	F	13	27	0.60	127/347	1	NAT2*5/12-Rápido <sup>c</sup>
2	M	15	66	1.5	857/548	-	NAT2*6/6-Lento
3	F	17	38	0.72	294/129	1, 3, 5	NAT2*5/6- Lento
4	M	14	31	1.05	270/143	2, 3,5	NAT2*6/6- Lento
5	F	11	42	4.56	25/19	1	NAT2*5/12-Rápido <sup>c</sup>
6	F	11	49	3.72	82/196	1, 3, 4	NAT2*5/12-Rápido <sup>c</sup>
7	M	14	44	1.09	53/196	3	NAT2*6/6-Lento
8	M	13	37	1.6	139/67	3, 4	NAT2*5/12- Rápido <sup>c</sup>
9	F	14	19	0.43	115/200	1	NAT2*5/6- Lento
10	M	8	30	0.55	105/53	3, 4	NAT2*5/5- Lento
11	F	8	51	0.82	271/193	1, 2	NAT2*5/5- Lento
12	M	17	46	0.61	196/391	3	NAT2*5/7- Lento
13	M	13	25	0.42	124/101		NAT2*6/6- Lento
14	F	90	25	1.61	131/125	1, 3	NAT2*4/13- Rápido

<sup>a</sup>Tempo até o diagnóstico da hepatotoxicidade <sup>b</sup>Fatores de risco: 1) sexo feminino, 2) HCV, 3) HIV, 4) HAART, 5) abuso de álcool, 6) desnutrição. <sup>c</sup>Apenas um alelo para acetilação rápida F= feminino; M= masculino; AST=alanina transaminase; ALT=aspartato transaminase; Pico= mais alto nível após o início do tratamento

#### 4.2.3. DESFECHO DO TRATAMENTO PRÉVIO E DO TRATAMENTO ATUAL *versus* PERFIL DE ACETILAÇÃO

Do total de pacientes analisados no presente estudo, 43 (16,9%) já haviam realizado tratamento para TB anteriormente. Sendo que destes, 20 (46,5%) foram readmitidos após alta por cura. Quando analisados os pacientes com recidiva após alta por cura em relação ao perfil de acetilação, observou-se que 19 (90,5%) eram acetiladores rápidos.

No tratamento atual, entre os 254 pacientes analisados, 232 (91,3%) concluíram tratamento na unidade de saúde. Cento e noventa e três (83,2%) pacientes obtiveram alta por cura, outros 28 (12,1%) abandonaram o tratamento após o terceiro mês de uso dos fármacos anti-TB, 7 (3,0%) tiveram falência terapêutica e 4 (1,7%) tiveram alta por óbito.

A frequência de acetiladores rápidos entre os pacientes com falha terapêutica foi de 71,4% e a falha terapêutica entre os acetiladores lentos foi de 28,6% ( $p=0,66$ ). Na tabela 9 estão descritas as frequências referentes ao perfil de acetilação e o desfecho do tratamento atual.

**Tabela 9: Análise do perfil de acetilação com relação ao desfecho do tratamento atual.**

Desfecho do Tratamento atual	Perfil de acetilação		Total N(%)
	Rápida N(%)	Lenta N(%)	
Cura	146 (84,5)	47 (79,7)	193 (83,2)
Abandono	20 (11,5)	8 (13,5)	28 (12,1)
Falência	5 (2,9)	2 (3,4)	7 (3,0)
Óbito	2 (1,1)	2 (3,4)	4 (1,7)
<b>Total</b>	<b>173 (74,6)</b>	<b>59 (25,4)</b>	<b>232 (100)</b>

## **5. DISCUSSÃO**

No artigo científico (subitem 4.1) que constitui o cerne da presente tese, assim como no subitem 4.2 onde apresentamos outros resultados não contemplados no artigo científico, foram avaliados os fatores de risco clínicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento de hepatotoxicidade e/ou efeitos adversos gastrintestinais com o uso de RMP, INH e PZA (RHZ) em uma amostra de pacientes da população de Porto Alegre.

## **5.1. AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS**

No presente estudo, foi observada uma incidência de hepatotoxicidade de 5,5% entre os pacientes analisados. A incidência reportada de casos de hepatotoxicidade e seus tipos clínicos em pacientes recebendo tratamento que contém RHZ varia consideravelmente na literatura médica. Estudos recentes incluindo pacientes ambulatoriais relatam uma incidência de hepatotoxicidade que varia de 2,4 a 16,2%, enquanto em pacientes hospitalizados esta taxa é um pouco mais elevada variando de 10,1 a 17%. Embora não completamente entendido estas variações poderiam ocorrer devido a diferentes critérios diagnósticos utilizados para definir hepatotoxicidade, as características e os fatores de risco da população estudada, a área geográfica ou o tipo de monitoramento realizado (Vidal *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 2002; Fernandez-Villar *et al.*, 2004; Agal *et al.*, 2005; Shakya *et al.*, 2005; Tost *et al.*, 2005; Gulbay *et al.*, 2006; Saukkonen *et al.*, 2006).

Com relação ao período de desenvolvimento de hepatotoxicidade, 13 (93%) pacientes desenvolveram até o primeiro mês de tratamento (78,6% nos primeiros 15 dias). Este número é similar àquele observado em estudos prévios com pacientes internados do HSP (Picon *et al.*, 1993). Teleman e colaboradores. (2002) em trabalho realizado em Singapura, demonstraram que 80% dos pacientes desenvolveram hepatotoxicidade dentro dos dois primeiros meses de tratamento. Estes resultados indicam que é importante evitar a prescrição de outros fármacos potencialmente tóxicos ao fígado durante os dois primeiros meses de tratamento com fármacos

anti-TB. Alguns estudos recomendam atrasar o início do HAART até a fase de continuação da terapia da TB (após os dois primeiros meses) para pacientes que são clinicamente estáveis com o intuito de reduzir as reações adversas (Dean *et al.*, 2002).

Na análise dos fatores clínicos descritos na literatura como de risco para hepatotoxicidade aos fármacos anti-TB, observou-se no presente estudo uma associação significativa entre hepatotoxicidade e infecção por HIV [OR= 4.6 (95% CI: 1.5 – 14.4); p<0.01]. Entretanto, o uso de HAART não foi um fator de risco aditivo para o desenvolvimento de hepatotoxicidade. De acordo com Moyle e Barton (1995), todas as classes de HAART são associadas com elevações assintomáticas dos níveis de ALT e AST, porém a incidência de hepatotoxicidade ao HAART é muito menos freqüente. Isto sugere a importância do próprio vírus HIV como fator de risco para hepatotoxicidade uma vez que a incidência de co-infecção TB/HIV vem aumentando no Rio Grande do Sul (Aerts and Jobim, 2004). Em 2003, na cidade de Porto Alegre, a incidência desta co-infecção era de 26,3% (SES-RS, 2007). Ungo *et al.* (1998), também observaram que o HIV é um fator de risco independente para hepatotoxicidade. Breen *et al.* (2006) descreveram que hepatotoxicidade ocorre em uma freqüência similar em ambos, pacientes HIV positivos (71% recebendo HAART) e negativos.

O teste para diagnóstico do HIV é feito após a primeira consulta do paciente no ambulatório de TB. Os resultados são enviados diretamente para o médico solicitante que informa o resultado para o paciente. No caso de um resultado positivo, o paciente é encaminhado para o ambulatório específico (mais próximo da residência do paciente) para o acompanhamento e tratamento do HIV. Os testes de carga viral e contagem de CD4 são solicitados somente quando o paciente entra no programa para acompanhamento do HIV. Os pacientes que chegam ao ambulatório de TB com diagnóstico positivo de HIV geralmente já estão em acompanhamento em algum ambulatório ou hospital de Porto Alegre. Devido a estes motivos não foram avaliados os resultados de carga viral e CD4 dos pacientes estudados.

Outros fatores de risco clínicos previamente descritos na literatura incluem idade avançada, sexo (feminino), abuso de álcool, história de hepatites virais, uso concomitante de outros fármacos hepatotóxicos, desnutrição, TB miliar, provas de função hepática anormais no início do tratamento e dosagem dos fármacos.

Muitos trabalhos já reportaram que idade avançada está associada com hepatotoxicidade (Picon *et al.*, 1993; Pande *et al.*, 1996; Schaberg *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2003). Teleman *et al.* (2002) referem que pacientes com idade superior a 60 anos estão mais susceptíveis ao desenvolvimento de hepatotoxicidade. Essa relação entre o desenvolvimento de hepatotoxicidade e a idade pode ser explicada pelas alterações morfológicas, bioquímicas e homeostáticas que surgem com o envelhecimento. Estas alterações colocam o paciente idoso em uma situação de risco no que se refere à prescrição de medicamentos devido à incidência aumentada de efeitos adversos. Embora a absorção dos fármacos pelo trato gastrointestinal não seja modificada, sua distribuição nos tecidos sofre influência de vários fatores que acabam por aumentar a concentração dos medicamentos nos líquidos tissulares (Picon *et al.*, 1993). No presente estudo, não foi observada associação entre idade e hepatotoxicidade, assim como observado por outros autores. (Ungo *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002; Gulbay *et al.*, 2006). Esse resultado pode estar relacionado com o baixo número de pacientes com idade acima de 60 anos (3,9% dos pacientes).

Com relação ao sexo (gênero), a frequência de homens do estudo é de 66,9%. A taxa de hepatotoxicidade entre as mulheres foi de 8,3%, o dobro daquela observada entre os homens, no entanto não se observou diferença significativa ( $p=0.23$ ). Shakya *et al.* (2005) também não encontraram associação entre o gênero e o desenvolvimento de hepatotoxicidade.

História de abuso de álcool é também referenciada como risco para hepatotoxicidade (Grönhagen-Riska *et al.*, 1978; Kopanoff *et al.*, 1978). Entretanto, em nosso estudo e de acordo com a maioria dos trabalhos mais atuais (Lee *et al.*, 2002; Anand *et al.*, 2005; Fountain *et al.*, 2005) história de abuso de álcool não foi associada com o risco de hepatotoxicidade. Em estudos

prévios realizados por Picon *et al.* (1993) incluindo pacientes do Rio Grande do Sul não foi observada nenhuma correlação de história de abuso de álcool e hepatotoxicidade. Kaneko *et al.* (2008), avaliando os fatores de risco para hepatotoxicidade aos fármacos anti-TB em pacientes com hepatite crônica (causada por vírus B ou C), observaram que a ingestão diária de mais de 20g de álcool é um fator de risco para hepatotoxicidade neste grupo de pacientes.

As doenças hepáticas crônicas, como cirrose hepática, infecção por HCV e HBV podem aumentar o risco de hepatotoxicidade induzida por fármacos. O mecanismo de ação não é bem conhecido, assim como o porquê de apenas um grupo de pessoas que recebem o tratamento com fármacos anti-TB desenvolverem algum dano hepático (Peretti *et al.*, 1987). Diversos autores já observaram associação entre a presença de HBV e/ou HCV e o desenvolvimento de hepatotoxicidade a fármacos anti-TB (Ungo *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2005; Shakya *et al.*, 2005). A infecção pelo HCV e/ou HBV foram investigadas como fatores confundidores neste estudo. 18,6% dos pacientes eram portadores do vírus C da hepatite e 1,2% do vírus B. Quando analisada a correlação entre HBV e/ou HCV com hepatotoxicidade não foi observada associação estatisticamente significativa (HBV  $p= 0.2$ ; HCV  $p= 0.5$ ). Yimer e colaboradores (2008) estudando uma população de pacientes da Etiópia, também, não encontraram associação entre positividade para anti-HCV e/ou HBsAg e o desenvolvimento de hepatotoxicidade.

Provavelmente, a falta de associação entre as características clínicas analisadas e o desenvolvimento de hepatotoxicidade poderia estar relacionada com o erro estatístico tipo II, isto é, devido ao pequeno número de pacientes arrolados no estudo.

## **5.2. ANÁLISE DO PERFIL DE ACETILAÇÃO DE NAT2 E FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NAT2**

Vários trabalhos demonstram que fatores genéticos como o perfil de acetilação de *NAT2* e o genótipo de *CYP2E1* também poderiam estar envolvidos como riscos potenciais para hepatotoxicidade, além dos fatores clínicos previamente descritos. Genes envolvidos na rota de metabolização da INH já foram estudados em outras populações e os dados da literatura demonstram que estes poderiam estar envolvidos na predisposição a hepatotoxicidade (Huang, 2007; Roy *et al.*, 2008).

Dessa forma, o objetivo principal do trabalho, como já mencionado, foi determinar a frequência de polimorfismos no gene *NAT2*, o perfil de acetilação de *NAT2* e sua relação com a incidência de hepatotoxicidade e/ou efeitos adversos gastrintestinais em uma população de pacientes ambulatoriais de Porto Alegre.

Neste estudo, encontrou-se associação do perfil de acetilação lenta com hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB ( $p < 0.005$ ; OR= 5.5; CI 95% 1.6 – 19.8), o que está de acordo com o descrito previamente por outros autores (Ohno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 2007; Bozok-Cetintas *et al.*, 2008).

Alguns estudos revelaram que acetiladores rápidos eram mais suscetíveis a hepatotoxicidade (Mitchel *et al.*, 1975), enquanto outros encontraram alto risco de hepatotoxicidade entre acetiladores lentos (Huang *et al.*, 2002; Bozok-Cetintas *et al.*, 2008). Ainda, outros autores não detectaram nenhuma relação entre o perfil de acetilação e hepatotoxicidade (Vuilleumier *et al.*, 2006). Na tabela 10, estão resumidamente descritos os resultados obtidos pelos principais autores que realizaram a genotipagem para *NAT2* e sua associação com hepatotoxicidade. A discrepância observada nos estudos prévios sobre acetilação e hepatotoxicidade aos fármacos anti-TB pode ser devida a diferentes delineamentos de estudos, especialmente com referência à metodologia para tipagem de *NAT2* (Mitchel *et al.*, 1975; Vuilleumier *et al.*, 2006), a combinação de fármacos utilizados (Ohno *et al.*, 2000; Vuilleumier *et al.*, 2006), e o critério para definição de hepatotoxicidade (Roy *et al.*, 2001; Bozok-Cetintas *et al.*, 2008). Embora muitos estudos tenham descrito exclusivamente aspectos clínicos como

fatores de risco para hepatotoxicidade, a INH e seus metabólitos tóxicos estão sendo apontados como causa de hepatotoxicidade (Fernandes-Villar *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Tostman *et al.*, 2008).

**Tabela 10: Estudos genotípicos para identificação de associação entre ADR/hepatotoxicidade com perfil de acetilação para NAT2.**

<b>Autor</b>	<b>População</b>	<b>Consideração ADR/Hep</b>	<b>Descrição</b>
Ohno <i>et al.</i> , 2000	Japoneses	AST e ALT acima de 2X ULN	77 pacientes; Tratamento: INH, RMP, PZA ou SM; Hepatotoxicidade:18.2%. O fenótipo lento foi significativamente associado com hepatotoxicidade.
Roy <i>et al.</i> , 2001	Japoneses	AST e ALT acima de 2X ULN combinado com aumento dos níveis de bilirrubina (>3.0mg/dL)	33 casos de hepatotoxicidade e 33 controles; Tratamento: INH, RMP, PZA, EMB; polimorfismos em NAT2 não foram associados com hepatotoxicidade.
Huang <i>et al.</i> , 2002	Japoneses	AST e ALT acima de 2X ULN combinado com aumento dos níveis de bilirrubina	224 pacientes; Tratamento: INH, RMP, PZA, EMB; 14.7% tiveram aumento dos níveis de transaminases, destes 6.3% desenvolveram hepatotoxicidade clinicamente significante. Acetiladores lentos apresentaram risco significativamente maior que os rápidos para desenvolverem hepatotoxicidade.
Hiratsuka <i>et al.</i> , 2002	Japoneses	ADR (incluindo náusea, vômito, febre, neurite periférica, elevação de tranaminases)	102 pacientes; Tratamento: INH (quimioprofilaxia); 5.9% desenvolveram ADR. A incidência de ADR foi significativamente maior entre os acetiladores lentos que entre acetiladores rápidos e intermediários.
Vuilleumier <i>et al.</i> , 2006	Cosmopolita	AST e ALT Acima de 4X ULN	89 pacientes; Tratamento: INH (quimioprofilaxia); Hepatotoxicidade: 9%. Não foi observada influência dos polimorfismos de NAT2 e hepatotoxicidade
Cho <i>et al.</i> , 2007	Coreanos	AST e ALT acima de 2X ULN	132 pacientes; Tratamento: INH, RMP, PZA, BEM; Hepatotoxicidade: 13,6%. Foi observado que o perfil de acetilação lenta está associado com o desenvolvimento de hepatotoxicidade.
Higuchi <i>et al.</i> , 2007	Japoneses	AST e ALT acima de 2X ULN combinado com aumento dos níveis de bilirrubina (>1,5.0mg/dL)	100 pacientes; Tratamento: INH, RMP; Hepatotoxicidade: 18%. Foi observada associação entre o genótipo 6A/7B e o desenvolvimento de hepatotoxicidade.
Bozok-Cetintas <i>et al.</i> , 2008	Turcos	ASL e ALT acima de 3X com ou sem sintomas e/ou bilirrubina acima de 1.6	100 pacientes foram estudados, 30 desenvolveram hepatotoxicidade, e foi observado que o perfil de acetilação lenta está significativamente associado com hepatotoxicidade.
<b>Possuelo <i>et al.</i>, 2008 (subitem 4.1)</b>	<b>Brasileiros</b>	<b>AST e/ou ALT acima de 3X ULN e/ou bilirrubina acima de 2.0 mg/mL combinado com sintomatologia.</b>	<b>254 pacientes; Tratamento: INH, RMP, PZA; Hepatotoxicidade: 5,5%. Foi observada associação entre o genótipo NAT2*6/6 e o fenótipo de acetilação lenta e o desenvolvimento de hepatotoxicidade.</b>

Ao contrário de outros estudos (Ohno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Hiratsuka *et al.*, 2002; Vuileumier *et al.*, 2006) os quais excluíram pacientes com infecção viral (HCV e HIV) além de usuários de álcool, nós não fomos capazes de excluir estes pacientes devido à alta incidência destas co-infecções e abuso de álcool na população estudada. Além disso, o tratamento de pacientes com essas características é rotina diária no ambulatório do HSP e em

todos os ambulatórios que atendem pacientes com TB em Porto Alegre, o que torna essencial a inclusão destes grupos de pacientes na análise, para termos um panorama da situação neste grupo de pacientes ambulatoriais.

Diversos trabalhos relatam que os baixos níveis plasmáticos de INH em acetiladores rápidos poderiam ser uma das razões para a falha terapêutica ocasional ou recidiva, assim como o perfil de acetilação rápida, também, poderia estar relacionado como uma das causas para este desfecho terapêutico (Weiner *et al.*, 2003; Kinzig-Schppers *et al.*, 2005). Weiner *et al.* (2003) descreveram que indivíduos com metabolização rápida da INH estão associados com a falência terapêutica ou recidiva após cura entre os pacientes tratados com regimes intermitentes (uma vez por semana com INH e rifamicina). Com relação ao desfecho do tratamento atual não foi possível observar nenhum tipo de associação com perfil de acetilação, provavelmente, devido ao baixo número de pacientes. Tam *et al.* (2002) em um ensaio clínico realizado em Hong Kong, demonstraram que pacientes com perfil de acetilação rápida não apresentaram taxas maiores de falência terapêutica.

A frequência do perfil de acetilação observada no presente estudo foi 27,2% de acetiladores lentos e 72,8% rápidos. A frequência de acetiladores lentos foi mais baixa que aquela observada em estudos incluindo populações caucasianas bem caracterizadas, onde o perfil de acetilação lenta encontrado é em torno de 50% (Agúndez *et al.*, 1994). O perfil de acetilação lenta é mais freqüente em populações de Caucasianos e Indianos, enquanto eles são menos freqüentes entre Japoneses e Chineses (Roy *et al.*, 2008).

Teixeira *et al.* (2007) estudaram duas diferentes populações brasileiras, uma de Goiás e outra do Rio de Janeiro, determinando o perfil de acetilação em 50% dos pacientes da população estudada. Eles relataram que destes, 49% apresentavam perfil de acetilação lenta. A baixa frequência do perfil de acetilação lenta observada em nosso estudo (27,2%) poderia estar relacionada com a baixa frequência do SNP 590A (10,2%) (cluster NAT2\*6). A frequência deste polimorfismo descrita por Teixeira *et al.* (2007) foi de 27%, significativamente maior que a

encontrada em nosso estudo ( $p < 0.01$ ). A frequência dos outros SNPs que caracterizam o perfil de acetilação lenta (341C e 857G), não foram estatisticamente diferentes entre os dois estudos. Bailleit *et al.* (2007) avaliando populações da Argentina e Paraguai, identificados como Ameríndios nas bases da localização geográfica, encontrou uma frequência de 9% do SNP 590A, somente em populações Argentinas. A frequência observada no presente estudo (10,4%) é similar a este valor.

Diversos SNPs com um papel reconhecido na determinação do fenótipo de acetilação são observados com frequências significativamente maiores em certos grupos étnicos. A variação G191A (cluster *NAT2\*14*) é mais prevalente em populações africanas, enquanto o SNP G857A (cluster *NAT2\*7*) é predominante em asiáticos e ameríndios. Gross e colaboradores (1999) avaliaram a frequência do polimorfismo G191A em 140 pacientes do grupo estudado e nenhum deles possuía essa variante alélica. Isto explica a baixa frequência destes polimorfismos no presente estudo, uma vez que a população estudada tem descendência de Portugueses, Italianos, Alemães bem como um grupo de descendentes Africanos. Os SNPs T341C (cluster *NAT2\*5*), C481T e A803G são usualmente observados em altas frequências entre europeus e africanos, corroborando com os achados desse estudo.

No presente estudo, observamos um total de 19 diferentes genótipos (subitem 4.1, tabela 3). O genótipo *NAT2\*12/5*, que é caracterizado pela presença dos polimorfismos T341C e A803G foi o mais freqüente na população estudada (31,4%). No estudo realizado por Teixeira *et al.* (2007), a frequência do genótipo *NAT2\*12/5* foi de 4,5%. Esta diferença se deve a alta frequência do polimorfismo A803G (64,5%) observada na população de Porto Alegre (subitem 4.1, tabela 1), significativamente maior que aquela encontrada por Teixeira *et al.* (2007). O perfil de acetilação lenta foi representado principalmente pelos genótipos *NAT2\*5/5*, com uma frequência de 13% e pelo genótipo *NAT2\*6/6* com uma frequência de 7,9%. Estes genótipos também foram predominantes entre os acetiladores lentos no estudo com pacientes do Rio de

Janeiro e Goiás (Teixeira *et al.* 2007) e entre os pacientes americanos estudados por Gross e colaboradores (1999).

Higuchi e colaboradores (2007) estudaram uma população de japoneses e observaram que o genótipo NAT2\*6/7 está significativamente associado com o desenvolvimento de hepatotoxicidade. No presente estudo, observamos que o genótipo NAT2\*6/6 está associado com hepatotoxicidade. Ambos os estudos demonstraram que o alelo NAT2\*6, caracterizado pela presença do polimorfismo G590A estão associados com o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de hepatotoxicidade.

O reconhecimento das diferenças interétnicas em relação à variabilidade encontrada em genes envolvidos com resposta aos fármacos poderia ser útil no estabelecimento de políticas de saúde pública, desenho e interpretação de ensaios clínicos e, possivelmente, guiar clínicos para avaliar prospectivamente quais os pacientes que poderiam ter uma probabilidade maior de expressar a variante genotípica associada com a resposta terapêutica (Suarez-Kurtz, 2005)

### **5.3. ANÁLISE DA TERAPIA UTILIZADA NOS CASOS DE HEPATOTOXICIDADE**

Em 1977 o esquema de tratamento para TB utilizando RMP, INH e EMB (RHM) foi padronizado pelo Programa de Controle da TB do Rio Grande do Sul. A utilização desse esquema teve como consequência um incremento da taxa de hepatotoxicidade. Esta aumentou de 2,2% com o esquema incluindo estreptomicina, tiacetazona e isoniazida (STH) para 7,3% com esquema RHM, nos pacientes internados no HSP (Picon *et al.*, 1993). Isso gerou a necessidade de buscar um esquema alternativo, chegando-se ao SHM (Picon *et al.*, 1993), que passou a ser utilizado nos casos de hepatotoxicidade pelo RHM e, mais tarde, nos casos de hepatotoxicidade pelo RHZ, quando este esquema substituiu o RHM no tratamento primário da TB, a partir de 1982.

Ainda no HSP, de 1982 a 1984, foram identificados como fatores de risco para hepatotoxicidade pelo RHZ: presença de TB miliar, mau estado clínico, sexo feminino e idade avançada. Em vista desses achados e, também, da observação de bons resultados com o uso do SHM em pacientes com hepatopatia medicamentosa, desde então, no HSP, passou-se a recomendar o esquema SHM, no lugar do RHZ, nas seguintes situações: mulheres com TB miliar e /ou mau estado clínico, homens com TB miliar e em mau estado clínico e pacientes com TB, portadores de doença hepática crônica.

Picon *et al.* (2002), com o intuito de observar o desempenho do SHM na rotina de trabalho de uma unidade ambulatorial estudaram uma população incluindo 45 pacientes com indicação para uso do SHM devido à injúria hepática relacionada com uso prévio de RHZ; eles observaram que, somente, um paciente teve sua terapia alterada devido à recorrência de hepatotoxicidade (2,2%). Os autores concluíram que a terapia contendo SHM tem uma boa tolerabilidade e uma excelente eficácia com uma taxa teórica de cura de 95,3%. A terapia alternativa com SHM foi utilizada por todos os pacientes que desenvolveram hepatotoxicidade ao RHZ no presente estudo, com uma taxa de cura de 83%. Atualmente este é um esquema recomendado pelo programa estadual de controle da TB, pelo Consenso brasileiro de TB e alguns outros autores também recomendam esta terapia como uma alternativa de tratamento após hepatotoxicidade ao RHZ (SES-RS, 2001; Teleman *et al.*, 2002; Castelo-Filho *et al.*, 2004). A descontinuação dos fármacos anti-TB leva a uma rápida recuperação da função hepática e a terapia com SHM poderia ser seguramente introduzida na maioria dos casos.

#### **5.4. SIGNIFICADO CLÍNICO DOS RESULTADOS EM FARMACOGENÉTICA**

Quando o assunto é farmacogenética, o que se espera é que os resultados observados nos estudos possam ser utilizados na prática clínica.

Uma das principais limitações da farmacogenética hoje, é que ela é principalmente experimental, baseada na correlação estatística gene-resposta e muito pouco verificável ao nível individual, na prática clínica. Atualmente, é crescente o número de pesquisas para o desenvolvimento de kits para diagnóstico farmacogenético a serem utilizados na prática clínica dentro da próxima década (Grossman, 2007). Estas expectativas são baseadas, primeiro e principalmente, em poucos exemplos de sucesso (Roses, 2001; McLeod and Silva, 2002; Penny and McHale, 2005; Yan and Beckman, 2005), os quais demonstraram um potencial para aplicação da farmacogenética na prática clínica diária e no gerenciamento de vários protocolos terapêuticos de diversas doenças (Grossman, 2007). Nos últimos anos, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou testes genéticos para identificação genotípica da TMPT (Tiopurina Metiltransferase) para pacientes que iniciariam o tratamento com azatioprina e mercaptopurina, visto que dependendo do genótipo apresentado o paciente pode ter uma susceptibilidade maior à neutropenia (Marsh and McLeod, 2006).

Um dos principais benefícios da implementação da farmacogenética, sem dúvida, será a redução de efeitos adversos aos medicamentos (Marsh and McLeod, 2006; Ingelman-Sundberg, 2008). Em uma meta-análise bastante citada em artigos publicados na área, verificou-se que reações adversas a medicamentos constituem a quinta causa de mortalidade nos Estados Unidos. A cada ano, milhões de prescrições resultam em efeitos adversos e destas, cerca de um milhão resulta em hospitalização e mais de 100.000 pacientes evoluem para o óbito (Lazarou *et al.*, 1998).

Após a introdução da INH no tratamento da TB, muitos estudos estão sendo realizados a respeito da utilização da dose mais apropriada deste fármaco (Kinzig-Schippers *et al.*, 2005; Donald *et al.*, 2007). Estes últimos pesquisadores sugerem através de seus experimentos, que pacientes com o perfil de acetilação lenta poderiam tomar 3mg/kg, o que seria suficiente para atingir os objetivos terapêuticos desejados no tratamento da TB, por outro lado, os acetiladores rápidos necessitam de 6 mg/kg para atingir a atividade bactericida ótima. No presente estudo, a

dose média de INH foi de 6,1 mg/kg/dia variando de 3,5-8,9mg/kg/dia. Esta dose não foi significativamente diferente entre acetiladores lentos e rápidos nem entre pacientes com ou sem hepatotoxicidade.

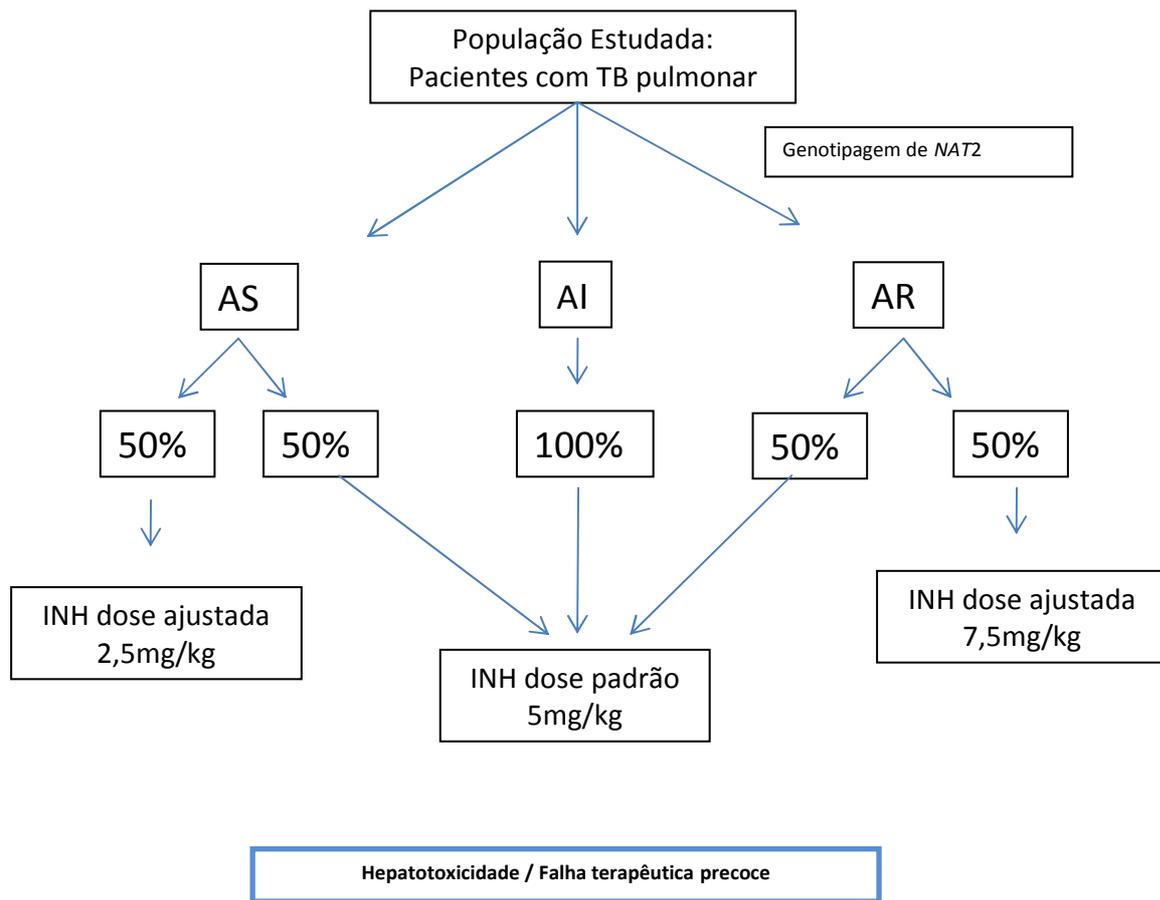
Nos resultados do presente estudo, podemos observar uma alta frequência de pacientes acetiladores rápidos (72%) e a dose de INH para estes pacientes está de acordo com o recomendado por Donald e colaboradores (2007) assim como preconizado pelo Ministério da Saúde. Entretanto, acetiladores lentos recebem doses mais elevadas de INH que aquelas indicadas por Donald e colaboradores (2007), mas as doses utilizadas estão de acordo com o recomendado pelo Programa de Controle da TB do Estado do RS (SES-RS, 2001).

Neste trabalho, foram apresentados resultados de associação entre pacientes que apresentavam perfil de acetilação lenta e a predisposição ao desenvolvimento de hepatotoxicidade, assim como observado em outros trabalhos. Dados de estudos prévios, também, demonstraram que acetiladores lentos foram encontrados com maior risco de hepatotoxicidade que os acetiladores rápidos (Ohno *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 2007). Dessa forma, seria de grande importância para aplicação na prática clínica, o desenvolvimento e padronização de um kit de baixo custo e de fácil aplicabilidade para genotipagem de *NAT2* em uma população de características genéticas conhecidas. A padronização deste teste teria o intuito de personalizar a dose terapêutica de INH e desta forma reduzir a frequência de hepatotoxicidade e a necessidade de alteração do esquema terapêutico utilizando SHM, como realizado no Rio Grande do Sul. Este esquema é mais prolongado que o RHZ (duração de um ano) e inclui um fármaco injetável que deve ser utilizado diariamente durante três meses. Augustynowicz-Kopéc e colaboradores (2007) padronizaram uma técnica de PCR-RFLP para a genotipagem de *NAT2*, e sugerem o uso desta técnica, rápida e de fácil aplicabilidade, para o monitoramento da terapia com INH. Atualmente, os benefícios potenciais do ajuste da dose de INH conforme o genótipo *NAT2* estão sendo avaliados em dois grandes estudos, um Europeu (IDANAT2) e um Asiático (Tomalik-Scharte *et al.*, 2008). Estes estudos testam as hipóteses do ajuste da dose terapêutica da

INH, da redução da falha terapêutica precoce em acetiladores rápidos e da redução da frequência de hepatotoxicidade em acetiladores lentos. A figura 5 mostra o fluxograma do IDANAT2.

Embora a disponibilidade de dados no campo ainda seja limitada e a necessidade de confirmação desses resultados em diferentes grupos étnicos seja necessária, projeta-se a aplicação de testes farmacogenéticos e farmacogenômicos na prevenção de hepatotoxicidade em um futuro próximo, conforme descrito por Huang (2007). A prevenção de reações adversas aos fármacos anti-TB poderiam aumentar a adesão ao tratamento e as taxas de cura, o que eventualmente poderia contribuir para melhorar o controle da TB (Tostmann *et al.*, 2008).

O conceito de uma terapia individualizada, onde o “fármaco certo é administrado na dose certa para o paciente correto” também é bastante promissor, pois a redução dos efeitos adversos além de ser alcançada pela seleção do melhor fármaco e a melhor dose para aqueles pacientes que tem metabolização deficiente, poderá ainda abrir as portas para a pesquisa e o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, que não sejam metabolizados por determinada enzima ou via (Hutz and Fiegenbaum, 2004).



INH= isoniazida; AS= Acetiladores lentos, AI= Acetiladores intermediários, AR= Acetiladores rápidos

**Figura 4: Esquema do estudo prospectivo, duplo-cego, multicêntrico (IDANAT2) para avaliar o possível benefício do ajuste da dose terapêutica de INH de acordo com o genótipo NAT2. Modificado de Tomalik-Sharte, *et al.* (2008).**

## **6. CONCLUSÕES**

Em resumo, os dados apresentados aqui, descrevem a frequência de SNPs para *NAT2* e o perfil de acetilação de *NAT2* em uma população do sul do Brasil. Nosso estudo é pioneiro no país e fornece evidências de associação do perfil de acetilação lenta e hepatotoxicidade a fármacos anti-TB. Entretanto, futuros estudos prospectivos devem ser realizados para determinar o perfil de acetilação de *NAT2* e sua correlação com hepatotoxicidade e fármacos anti-TB em diferentes regiões do país. Considerando a limitação do estudo, devido ao baixo número de casos de hepatotoxicidade, estudos multicêntricos adicionais, com um maior número de casos de hepatotoxicidade, serão necessários para confirmar estes achados. Ensaios clínicos poderiam ser realizados para avaliar o desempenho do teste de genotipagem para *NAT2* como uma ferramenta de rotina na prática clínica para identificar, previamente, pacientes sob alto risco para hepatotoxicidade nesta população.

Embora a presente tese tenha envolvido um pequeno número de pacientes, os resultados da mesma, assim como, os dados relatados em outros trabalhos deixam claro que a diversidade do genoma humano é um fator muito importante a ser analisado, quando se trata de hepatotoxicidade ao RHZ. No entanto, ainda existem vários e grandes obstáculos a serem superados que incluem a padronização e a redução do custo de exames de DNA. Apesar disso, a implementação da farmacogenômica iniciará uma nova era na medicina, onde teremos a oportunidade de experimentar o uso de medicações de acordo com o perfil genético de cada indivíduo. Os resultados acumulados até o momento são bastante encorajadores e sugerem que o conceito da “dose certa para o paciente certo” pode se tornar realidade.

## **7. PERSPECTIVAS**

Como perspectivas do presente estudo, podemos incluir:

- Realização de estudos para identificar polimorfismos nos outros genes envolvidos na rota de metabolização da INH, (*CYP2E1* e *GSTM1*) e sua correlação com hepatotoxicidade.

- Realização de um ensaio clínico com a população atendida no ambulatório de tisiologia do Hospital Sanatório Partenon para avaliar a personalização da dose terapêutica de INH de acordo com o genótipo do paciente, com o intuito reduzir a incidência de hepatotoxicidade e de falência terapêutica nesta população, assim como estudo descrito por Tomalik-Scharte *et al.* (2008).

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aaron L, Saadoun D, Calatroni I, Launay O et al.**, Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. **Review J.** 2004; 1469-0691.
- Aerts D, Jobim R.** The epidemiological profile of tuberculosis in southern Brazil in times of AIDS. **Int J Tuberc Lung Dis** 2004; 8(6): 785-91.
- Agal S, Baijal R, Pramanik S, Patel N, Gupte P, Kamani P, Amarapurkar D.** Monitoring and management of antituberculosis drug induced hepatotoxicity. **J Gastroenterol Hepatol.** 2005; 20(11):1745-52.
- Agúndez JA, Martínez C, Olivera M, Ledesma MC, Ladero JM, Benítez J.** Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population. **Clin Pharmacol Ther.** 1994; 56(2):202-9.
- Agúndez JAG.** NAT2 Genotyping: Equilibrium Between Accuracy and Feasibility in Routine Analyses. **J Appl Res.** 2003; 3:1-6.
- Al-Yahyaee S, Gaffar U, Al-Ameri MM, Qureshi M, Zadjali F, Ali BH, Bayoumi R.** N-acetyltransferase polymorphism among northern Sudanese. **Hum Biol.** 2007;79(4):445-52
- Ambrosone CB, Kropp S, Yang J, Yao S, Shields PG, Chang-Claude J.** Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genotypes, and breast cancer risk: pooled analysis and meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2008;17(1):15-26.
- Anand AC, Seth AK, Paul M, Puri P.** Risk Factors of hepatotoxicity during anti-tuberculosis treatment. **MJAFL.** 2005; 62: 45-49.
- Attitallah S, Bechtel YC, Belkahia C, Bechtel PR.** Analysis of N-acetyltransferase (NAT2) in three ethnic groups in Tunisia. **Therapie.** 2000; 55(3):361-9.
- Attri S, Rana SV, Vaiphei K, Sodhi CP, Katyal R, Goel RC, Nain CK, Singh K.** Isoniazid- and rifampicin-induced oxidative hepatic injury--protection by N-acetylcysteine. **Hum Exp Toxicol.** 2000; 19(9):517-22.
- Augustynowicz-Kopeć E, Zabost A, Kozińska M, Brzezińska S, Zwolska Z.** Detection of mutation in NAT II gene as a method of determination of izoniazid (INH) acetylation type in human population. **Pneumonol Alergol Pol.** 2007; 75(2):134-9.
- Bailliet G, Santos MR, Alfaro EL, Dipierri JE, Demarchi DA, Carnese FR, Bianchi NO.** Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. **Mutat Res.** 2007; 627(2):171-7.
- Bates DW, Cullen DJ, Laird N, Petersen LA, Small SD, Servi D, Laffel G., Sweitzer BJ, Shea BF, Hallisey R, Vliet MV, Nemeskal R, Leape LI.** Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events. **Jama.** 1995; 274:29-34.
- Bates JH.** Transmission and pathogenesis of tuberculosis. **Clin Chest Med.** 1980; 1(2):167-74.
- Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW.** Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2)

- reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. **Carcinogenesis**. 1993;14(8):1689-92.
- Benèchou C.** Criteria of drug-induced liver disorders:report of an international concensus meeting. **J. Hepatol**. 1990; 11:272-276.
- Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA.** Human Arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. **DNA and Cell Biology**. 1990; 9:193-203.
- Bondy B, Zill P.** Pharmacogenetics and psychopharmacology. **Cur. Opin. Pharmacol**. 2004; 4: 72-78.
- Bozok Çetintaş V, Erer OF, Kosova B, Ozdemir I, Topçuoğlu N, Aktoğu S, Eroğlu Z.** Determining the relation between N-acetyltransferase-2 acetylator phenotype and antituberculosis drug induced hepatitis by molecular biologic tests. **Tuberk Toraks**. 2008; 56(1):81-86.
- Brasil.** Ministério da Saúde. Manual técnico para o controle da Tuberculose: Cadernos de atenção básica – 2002; 6ª ed Rev Ampl. Brasília.
- Breen RA, Miller RF, Gorsuch T, Smith CJ, Schwenk A, Holmes W, Ballinger J, Swaden L, Johnson MA, Cropley I, Lipman MC.** Adverse events and treatment interruption in tuberculosis patients with and without HIV co-infection. **Thorax**. 2006; 61(9):791-4.
- Brockmöller J, Tzvetkov MV.** Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. **Eur J Clin Pharmacol**. 2008; 64(2):133-57.
- Brockmöller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I.** Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. **Cancer Res**. 1996; 56(17):3915-25.
- Capella D, Laporte JR.** Mecanismos de Produção e Diagnóstico Clínico dos Efeitos Indesejáveis Produzidos por Medicamentos. In: LAPORTE, J.R., TOGNONI, G., ROZENFELD, S. Epidemiologia do Medicamento. São Paulo- Rio de Janeiro: HUCITEC-ABRASCO, 1989. 264p. (p.115-124).
- Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Kahn MA.** Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. **Lancet**. 1982; 2(8303):842-5.
- Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmöller J, Maurer A, Sperling K, Roots I.** Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. **Am J Hum Genet**. 1995; 57(3):581-92.
- Castelo A, Jardim JR, Goihman S, Kalckman AS, Dalboni MA, da Silva EA, Haynes RB.** Comparison of daily and twice-weekly regimens to treat pulmonary tuberculosis. **Lancet**. 1989; 18; 2(8673):1173-6.

- Castelo Filho A, Kritski AL, Barreto AW, Lemos ACM, Neto AR, Guimarães CA, Silva, CL.** II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. **J Bras Pneumol** 2004; 30 suppl 1
- Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CS, Nam MH, Kim JW, Lee SY.** Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**. 2007; 87(6):551-6.
- Classen DC, Pestotnik SI, Evans S, Lloyd JF, Burke JP.** Adverse Drug Events in Hospitalized Patients. Excess Length of Stay, Extra Costs, and Attributable Mortality. **Jama**. 1977; 277:301-306.
- Combs DL, O'Brien RJ, Geiter LJ.** USPHS tuberculosis short-course chemotherapy trial 21: effectiveness, toxicity and acceptability. The reports of final results. **Ann. Int. Med.** 1990; 112: 397-406.
- Consensus Arylamine N-Acetyltransferase (NAT) Gene Nomenclature.** 2008. [www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html](http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html).
- Conti, LMZ.** Reações adversas a medicamentos. **A Folha Médica**. 1979; 78:29-33.
- Dean GL, Edwards SG, Ives NJ, Matthews G, Fox EF, Navaratne L, Fisher M, Taylor GP, Miller R, Taylor CB, de Ruiter A, Pozniak AL.** Treatment of tuberculosis in HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. **AIDS**. 2002;16(1):75-83.
- Deitz AC, Zheng W, Leff MA, Gross M, Wen WQ, Doll MA, Xiao GH, Folsom AR, Hein DW** N-Acetyltransferase-2 genetic polymorphism, well-done meat intake, and breast cancer risk among postmenopausal women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 200;9(9):905-10.
- Deloménie C, Sica L, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM.** Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2\*) gene locus in two native African populations. **Pharmacogenetics**. 1996;6(2):177-85.
- Donald PR, Parkin DP, Seifart HI, Schaaf HS, van Helden PD, Werely CJ, Sirgel FA, Venter A, Maritz JS** The influence of dose and N-acetyltransferase-2 (NAT2) genotype and phenotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of isoniazid. **Eur J Clin Pharmacol**. 2007;63(7):633-9.
- Edwards IR.** Pharmacological Basis of Adverse Drug Reactions. In: SPEIGHT, TM and HOLFORD, NHG Avery's Drug Treatment, 4nd ed. Barcelona: Adis International, 1997. 1852p. (p.261-300).
- Ellard GA.** Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis. **Clin. Pharmacol. Ther.** 1976;19: 610-625.
- Ellard GA, Gammon PT, Wallace SM.** The determination of isoniazid and its metabolites acetylisoniazid, monoacetylhydrazine, diacetylhydrazine, isonicotinic acid and isonicotinylglycine in serum and urine. **Biochem J**. 1972; 126(3):449-58.

- Evans WE, McLeod HL.** Pharmacogenomics - Drug Disposition, Drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 538-549.
- Evans WE, Jonhson JA.** Pharmacogenomics: The Inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001; 2: 9-39.
- Evans WE, Relling MV.** Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science.* 1999; 286: 487-491.
- Evans DAP, White T A.** Human acetylation polymorphism. *J. Lab. Clin Med.* 1964; 63:394-401.
- Fernández-Villar A, Sopena B, Fernández-Villar J, Vázquez-Gallardo R, Ulloa F, Leiro V, Mosteiro M, Piñeiro L.** The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8(12):1499-505.
- Filiadis IF, Georgiou I, Alamanos Y, Kranas V, Giannakopoulos X, Lolis D.** Genotypes of N-acetyltransferase-2 and risk of bladder cancer: a case-control study. *J Urol.* 1999; 161(5):1672-5.
- Fountain FF, Tolley E, Chrisman CR, Self TH.** Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: a 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic. *Chest.* 2005 Jul; 128(1):116-23.
- Gago-Dominguez M, Bell DA, Watson MA, Yuan JM, Castelao JE, Hein DW, Chan KK, Coetzee GA, Ross RK, Yu MC.** Permanent hair dyes and bladder cancer: risk modification by cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferases 1 and 2. *Carcinogenesis.* 2003;24(3):483-9.
- García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real FX, Rothman N.** NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.* 2005;366(9486):649-59
- Garg PK, Tandon RK.** Antituberculosis agents induced liver injury. In: Drug Induced liver disease. Kaplowitz N, Deleve LD (Eds). Marcel Dekker, New York, USA, 2003.
- Gemignani F, Landi S, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L, Janout V, Bencko V, Gaborieau V, Gioia-Patricola L, Bellini I, Barale R, Canzian F, Hall J, Boffetta P, Hung RJ, Brennan P.** Development of lung cancer before the age of 50: the role of xenobiotic metabolizing genes. *Carcinogenesis.* 2007;28(6):1287-93.
- Goldstein D, Tate SK, Sisodiya SM.** Pharmacogenetics goes genomic. *Nature reviews* 2003; 4: 937-947.
- Gonzalez FJ, Idle JR.** Pharmacogenetic Phenotyping and Genotyping Present Status and Future Potential. *Clin Pharmacokinet.* 1994; 26:59-70.

- Goodman and Gilman.** *As bases farmacológicas da terapêutica.* McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. 9<sup>o</sup> ed. 2004.
- Grönhagen-Riska C, Hellstrom PE, Fröseth B.** Predisposing factors in hepatitis induced by isoniazid-rifampin treatment of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1978; 118(3):461-6.
- Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R, Kadlubar F.** Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8(8):683-92.
- Grossman I.** Routine pharmacogenetic testing in clinical practice: dream or reality? *Pharmacogenomics.* 2007; 8(10):1449-59.
- Guengerich F.** Human cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano P. (ed): *Cytochrome P450*, 2<sup>nd</sup> ed. Plenum, New York, 1995, pp. 473-535.
- Gülbay BE, Gürkan OU, Yildiz OA, Onen ZP, Erkeköl FO, Baççioğlu A, Acican T.** Side effects due to primary antituberculosis drugs during the initial phase of therapy in 1149 hospitalized patients for tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(10):1834-42.
- Gurumurthy P, Krishnamurthy MS, Nasareth O, Parthasarthy R, Samara GR, Somasundaran PR.** Lack of relationship between hepatotoxicity and acetylator phenotype in three thousand south Indian patients during treatment with isoniazid for tuberculosis. *Am. Rev. Respir Dis.* 1984; 129:58-61.
- Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, Endo N, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS, Mizugaki M.** Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol.* 2003; 55(6):560-9.
- Hein DW, Boukouvala S, Grant DM, Minchin RF, Sim E.** Changes in consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 Apr;18(4):367-8.
- Hein DW.** N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene.* 2006;25(11):1649-58.
- Hein DW, McQueen CA, Grant DM, Goodfellow GH, Kadlubar FF, Weber WW.** Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases: a symposium in honor of Wendell W. Weber. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28(12):1425-32.
- Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Ferguson RJ.** Metabolic activation of N-hydroxyarylamines and N-hydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer Res.* 1995; 55(16):3531-6.
- Hickman D, Palamanda JR, Unadkat JD, Sim E.** Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine N-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50(5):697-703.
- Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, Miyazaki Y, Kobayashi T, Yoshiura K, Niikawa N, Wen CY, Isomoto H, Shikuwa S, Omagari K, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K.** 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.** 2007;13(45):6003-8.
- Hiratsuka M, Kishikawa Y, Takekuma Y, Matsuura M, Narahara K, Inoue T, Hamdy SI, Endo N, Goto J, Mizugaki M.** Genotyping of the N-acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002; 17(4):357-62.
- Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY, Chang FY, Lee SD.** Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology.** 2002; 35(4):883-9.
- Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD.** Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology.** 2003; 37(4):924-30.
- Huang YS, Su WJ, Huang YH, Chen CY, Chang FY, Lin HC, Lee SD.** Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol.* 2007; 47(1):128-34.
- Huang YS.** Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** 2007; 3(1):1-8.
- Hutz MH, Fiegenbaum M.** Farmacogenômica. *In:* Luís Mir. (Org.). Genômica. 1/1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, p. 663-676.
- Ingelman-Sundberg M.** Pharmacogenomic biomarkers for prediction of severe adverse drug reactions. **N Engl J Med.** 2008; 358(6):637-9.
- Ingelman-Sundberg M.** Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. **J Intern Med.** 2001; 250: 186-200.
- Jorge-Nebert LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD.** Analysis of six SNPs of NAT2 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and determination of the Embera acetylation phenotype using caffeine. **Pharmacogenetics.** 2002; 12(1):39-48.
- Kalow W, Spielberg S.** Farmacogenética Humana, *In:* KALANT, H, ROSCHLAU, WHE. Princípios de Farmacologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 687p. (97-103).
- Kaneko Y, Nagayama N, Kawabe Y, Shimada M, Suzuki J, Kunogi M, Matsui Y, Kawashima M, Suzuki J, Ariga H, Oshima N, Masuda K, Matsui H, Nagai H, Tamura A, Akagawa S, Toyoda E, Machida K, Kurashima A, Yotsumoto H.** Drug-induced hepatotoxicity caused by anti-tuberculosis drugs in tuberculosis patients complicated with chronic hepatitis. **Kekkaku.** 2008; 83(1):13-9.
- Kashuba AD, Bertino JS Jr, Kearns GL, Leeder JS, James AW, Gotschall R, Nafziger AN.** Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. **Clin Pharmacol Ther.** 1998; 63(5):540-51.

- Kaufmann SH, van Embden JD.** Tuberculosis: a neglected disease strikes back. *Trends Microbiol.* 1993;1(1):2-5.
- Kinzig-Schippers M, Tomalik-Scharte D, Jetter A, Scheidel B, Jakob V, Rodamer M, Cascorbi I, Doroshyenko O, Sörgel F, Fuhr U.** Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses? *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5):1733-8.
- Kita T, Tanigawara Y, Chikazawa S, Hatanaka H, Sakaeda T, Komada F, Iwakawa S, Okumura K.** N-Acetyltransferase 2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24(5):544-9.
- Kwon YS, Koh WJ, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ.** Hepatitis C virus infection and hepatotoxicity during antituberculosis chemotherapy. *Chest.* 2007; 131(3):803-8.
- Kopanoff DE, Snider DE, Caras GJ.** Isoniazid-Related Hepatitis: A U. S. Public Health Service Cooperative Surveillance Study. *Am Rev Respir Dis.* 1978; 117:991-1001.
- Kritski AL; Conde MB, Muzi de Souza GR.** Tuberculose do Ambulatório à Enfermaria; 3ª ed; Atheneu; 2005.
- Kukongviriyapan V, Prawan A, Tassaneyakul W, Aiemsard J, Warasiha B.** Arylamine N-acetyltransferase-2 genotypes in the Thai population. *Br J Clin Pharmacol.* 2003; 55(3):278-81.
- Lauterburg BH, Smith CV, Todd EL, Mitchell JR.** Oxidation of hydrazine metabolites formed from isoniazid. *Clin Pharmacol Ther.* 1985; 38(5):566-71.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN.** Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta analysis of prospective studies. *Jama.* 1998; 279:1200-1205.
- Lee AM, Mennone JZ, Jones RC, Paul WS.** Risk factors for hepatotoxicity associated with rifampin and pyrazinamide for the treatment of latent tuberculosis infection: experience from three public health tuberculosis clinics. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6(11):995-1000.
- Lee JM, Lee YC, Yang SY, Shi WL, Lee CJ, Luh SP, Chen CJ, Hsieh CY, Wu MT.** Genetic polymorphisms of p53 and GSTP1, but not NAT2, are associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer.* 2000; 89(5):458-64.
- Lehninger AL, Nelson D, Cox MM.** *Princípios de Bioquímica.* 2.ed São Paulo: SARVIER (reimpressão), 2000.
- Lei B, Wei CJ, Tu SC.** Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by Mycobacterium tuberculosis KatG, isolation, and characterization of inha inhibitor. *J Biol Chem.* 2000; 275(4):2520-6.
- Li D, Jiao L, Li Y, Doll MA, Hein DW, Bondy ML, Evans DB, Wolff RA, Lenzi R, Pisters PW, Abbruzzese JL, Hassan MM.** Polymorphisms of cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase genes, smoking, and risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2006; 27(1):103-11.

- Maddrey WC.** Drug-induced hepatotoxicity: 2005. **J Clin Gastroenterol.** 2005; 39:S83-9.
- Mariappan TT, Singh S.** Regional gastrointestinal permeability of rifampicin and isoniazid (alone and their combination) in the rat. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2003; 7(8):797-803.
- Mattila MJ, Nieminen E, Tiitinen H.** Serum levels, urinary excretion, and side-effects of cycloserine in the presence of isoniazid and p-aminosalicylic acid. **Scand J Respir Dis.** 1969; 50(4):291-300.
- Marsh S, McLeod HL.** Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice. **Hum Mol Genet.** 2006; 15 (1):R89-93.
- McLeod HL, Siva C.** The thiopurine S-methyltransferase gene locus - implications for clinical pharmacogenomics. **Pharmacogenomics.** 2002; 3(1):89-98.
- Mitchell JR, Thorgeirsson UP, Black M, Timbrell JA, Snodgrass WR, Potter WZ, Jollow HR, Keiser HR.** Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydranize metabolites. **Clin Pharmacol Ther.** 1975; 18(1):70-9.
- Moslehi R, Chatterjee N, Church TR, Chen J, Yeager M, Weissfeld J, Hein DW, Hayes RB.** Cigarette smoking, N-acetyltransferase genes and the risk of advanced colorectal adenoma. **Pharmacogenomics.** 2006; 7(6):819-29.
- Moyle GL, Barton SE.** HIV-protease inhibitors in the management of HIV-infection. **J Anticomb Chemother** 1995; 38:921-925.
- Nelson SD, Mitchell JR, Timbrell JA, Snodgrass WR, Corcoran GB 3rd.** Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. **Science.** 1976 Sep 3;193(4256):901-3
- Oberg, KC.** Adverse drug reactions. **Am. J. Pharm. Educ.** 1999; 63:199-204.
- Ognjanovic S, Yamamoto J, Maskarinec G, Le Marchand L.** NAT2, meat consumption and colorectal cancer incidence: an ecological study among 27 countries. **Cancer Causes Control.** 2006; 17(9):1175-82.
- Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto Y, Ogura T, Maeda K, Komuta K, Igarashi T, Azuma J.** Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2000; 4(3):256-61.
- Okkels H, Sigsgaard T, Wolf H, Autrup H.** Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 1997; 6(4):225-31.
- Pan L, Jia ZS, Chen L, Fu EQ, Li GY.** Effect of anti-tuberculosis therapy on liver function of pulmonary tuberculosis patients infected with hepatitis B virus. **World J Gastroenterol.** 2005;11(16):2518-
- Pande JN, Singh SP, Khilnani GC, Khilnani S, Tandon RK.** Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. **Thorax.** 1996; 51(2):132-6.

- Pang T.** Impact of pharmacogenomics on neglected diseases of the developing world. **Am J Pharmacogenomics.** 2003; 3(6):393-8.
- Patin E, Harmant C, Kidd KK, Kidd J, Froment A, Mehdi SQ, Sica L, Heyer E, Quintana-Murci L.** Sub-Saharan African coding sequence variation and haplotype diversity at the NAT2 gene. **Hum Mutat.** 2006; 27(7):720.
- Penny MA, McHale D.** Pharmacogenomics and the drug discovery pipeline: when should it be implemented? **Am J Pharmacogenomics.** 2005;5(1):53-62.
- Peretti E, Karlaganis G, Lauterburg BH.** Increased urinary excretion of toxic hydrazino metabolites of isoniazid by slow acetylators. Effect of a slow-release preparation of isoniazid. **Eur J Clin Pharmacol.** 1987; 33(3):283-6.
- Peters JH, Gordon GR, Brown P.** The relationship between the capacities of human subjects to acetylate isoniazid, sulfanilamide and sulfamethazine. **Life Sciences.** 1965; 4: 99-107.
- Picon PD, Della Giustina ML, Rizon, CFC.** Resultado do tratamento da tuberculose com estreptomicina, isoniazida e etambutol (esquema SHM). **J. Pneumol.** 2002; 28(4):187-192.
- Picon PD, Jarczewski CA, Unis G, et al.** Hepatotoxicidade da rifampicina, isoniazida e pirazinamida (RHZ) em pacientes sob tratamento ambulatorial para tuberculose. **J. Pneum.** 2004; 30(supp 3): S168.
- Picon PD, Rizzon CF, Picon MIX, Souza AAL.** Hepatopatia aos tuberculostáticos. In: Picon P D, Rizzon C F C, Ott W P. Tuberculose: Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento em Clínica e Saúde Pública. Rio de Janeiro, Brasil: MEDSI, 1993: pp 543-558.
- Rao KV, Mitchison DA, Nair NG, Prema K, Tripathy SP.** Sulphadimidine acetylation test for classification of patients as slow or rapid inactivators of isoniazid. **Br Med J.** 1970; 3(5721):495-7.
- Raviglione SN, O'Brien RJ.** Tuberculose, In Harrison, Medicina Interna, Volume 1; 14 ed., p.1074-1085; 1998.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME.** Global variation in copy number in the human genome. **Nature.** 2006; 444(7118):444-54.
- Rihs HP, John A, Scherenberg M, Seidel A, Brüning T.** Concordance between the deduced acetylation status generated by high-speed: real-time PCR based NAT2 genotyping of seven single nucleotide polymorphisms and human NAT2 phenotypes determined by a caffeine assay. **Clin Chim Acta.** 2007; 376(1-2):240-3.
- Risch A, Wallace DM, Bathers S, Sim E** Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. **Hum Mol Genet.** 1995; 4(2):231-6.

- Roberts-Thomson IC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ, Butler RN.** Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. **Lancet.** 1996; 347(9012):1372-4.
- Roden, DM.** Pharmacogenetics and drug-induced arrhythmias. **Cardiovascular research.** 2001; 50: 224-231.
- Rodrigues-Lima F, Dupret JM.** 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 Biophys Res Commun.** 2002; 291(1):116-23.
- 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.** 2001; 16(9):1033-7.
- Roy PD, Majumder M, Roy B.** Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. **Pharmacogenomics.** 2008; 9(3):311-21.
- Roses AD.** Pharmacogenetics. **Hum Mol Genet.** 2001;10(20):2261-7.
- Rothman N, Hayes RB, Bi W, Caporaso N, Broly F, Woosley RL, Yin S, Feng P, You X, Meyer UA.** Correlation between N-acetyltransferase activity and NAT2 genotype in Chinese males. **Pharmacogenetics.** 1993 Oct;3(5):250-5.
- Rovito PM Jr, Morse PD, Spinek K, Newman N, Jones RF, Wang CY, Haas GP.** Heterocyclic amines and genotype of N-acetyltransferases as risk factors for prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** 2005; 8(1):69-74.
- Rychlik-Sych M, Skretkiewicz J, Gawrońska-Szklarz B, Górnik W, Sysa-Jedrzejowska A, Skretkiewicz-Szarmach K.** Acetylation genotype and phenotype in patients with systemic lupus erythematosus. **Pharmacol Rep.** 2006; 58(1):22-9.
- Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES.** Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. **BMC Genet.** 2008; 9(1):21.
- Sabbagh A, Darlu P.** Inferring haplotypes at the NAT2 locus: the computational approach. **BMC Genet.** 2005; 6(1):30.
- Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, Peloquin CA, Gordin FM, Nunes D, Strader DB, Bernardo J, Venkataramanan R, Sterling TR; ATS (American Thoracic Society) Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy Subcommittee.** An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. **Am J Respir Crit Care Med.** 2006 Oct 15;174(8):935-52
- Schaberg T, Rebhan K, Lode H.** Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. **Eur Respir J.** 1996; 9(10):2026-30.

- Schnakenberg E, Ehlers C, Feyerabend W, Werdin R, Hübotter R, Dreikorn K, Schloot W.** Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) and loss of heterozygosity in bladder cancer patients. **Clin Genet.** 1998; 53(5):396-402.
- Sekine A, Saito S, Iida A, Mitsunobu Y, Higuchi S, Harigae S, Nakamura Y.** Identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of human N-acetyltransferase genes NAT1, NAT2, AANAT, ARD1 and L1CAM in the Japanese population. **J Hum Genet.** 2001; 46(6):314-9.
- Self TH, Chrisman CR, Baciewicz AM, Bronze MS.** Isoniazid drug and food interactions. **Am J Med Sci.** 1999; 317(5):304-11.
- SES-RS.** Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual da Saúde (2001) Norma Técnica da política de Controle da Tuberculose. Porto Alegre.
- SES-RS.** Secretaria Estadual da Saúde, Estado do Rio Grande do sul, Coordenação de Atenção Integral à Saúde, Coordenação de Pneumologia Sanitária, Tuberculose; 2007.
- Severino G, Del Zompo M.** Adverse drug reactions: role of pharmacogenomics. **Pharmacol Res.** 2004; 49(4):363-73.
- SINAN/MS** Sistema Nacional de Agravos notificados/ Ministério da Saúde. [tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe/idx2006/d0202.def](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe/idx2006/d0202.def)),
- Shakya R, Rao BS, Shrestha B.** Management of antitubercular drugs-induced hepatotoxicity and therapy reintroduction strategy in a TB clinic of Nepal. **Kathmandu Univ Med J (KUMJ).** 2005; 3(1):45-9.
- Sharma SK, Balamurugan A, Saha PK, Pandey RM, Mehra NK.** Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. **Am J Respir Crit Care Med.** 2002; 166(7):916-9.
- Sillanpää P, Hirvonen A, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Uusitupa M, Vainio H, Mitrunen K.** NAT2 slow acetylator genotype as an important modifier of breast cancer risk. **Int J Cancer.** 2005; 114(4):579-84.
- Singh J, Garg PK, Thakur VS, Tandon RK.** Antitubercular treatment induced hepatotoxicity: does acetylator status matter? **Indian J Physiol Pharmacol.** 1995; 39:43-46
- Suarez-Kurtz G.** Pharmacogenomics in admixed populations. **Trends Pharmacol Sci.** 2005 Apr;26(4):196-201
- Tam CM, Chan SL, Kam KM, Goodall RL, Mitchison DA.** Rifapentine and isoniazid in the continuation phase of a 6-month regimen: final report at 5 years: prognostic value of various measures. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2002;6:3–10.
- Teixeira RL, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQ, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, Melo HM, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, Santos AR.** Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. **Mutat Res.** 2007; 624(1-2):31-40.

- Teleman MD, Chee CB, Earnest A, Wang YT.** Hepatotoxicity of tuberculosis chemotherapy under general programme conditions in Singapore. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2002; 6(8):699-705.
- Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner J.** The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. **Pharmacogenomics J.** 2008; 8(1):4-15.
- Torkaman-Boutorabi A, Hoormand M, Naghdi N, Bakhshayesh M, Milanian I.** Genotype and allele frequencies of N-acetyltransferase 2 and glutathione S-transferase in the Iranian population. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2007; 34(11):1207-11.
- Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WC, van der Ven AJ, Dekhuijzen R.** Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. **J Gastroenterol Hepatol.** 2008; 23(2):192-202.
- Ungo JR, Jones D, Ashkin D, Hollender ES, Bernstein D, Albanese AP, Pitchenik AE.** Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. The role of hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. **Am J Respir Crit Care Med.** 1998; 157(6):1871-6.
- Upton A, Johnson N, Sandy J, Sim E.** Arylamine N-acetyltransferases- of mice, men and microorganisms. **TRENDS in Pharmacol. Sci.** 2001; 22: 140-146.
- Vale NB, Delfino J, Vale LFB.** O conhecimento de diferenças raciais pode evitar reações idiossincráticas na anestesia? **Rev. Bras. Anesthesiol.** 2003; 53: 258-268.
- Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Evans DA, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV.** Nomenclature for N-acetyltransferases. **Pharmacogenetics.** 1995; 5(1):1-17.
- Vuilleumier N, Rossier MF, 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.** 2006; 62(6):423-9.
- Weber WW.** Populations and genetic Polymorphisms. **Molecular Diagnosis.** 1999; 26: 299-306.
- Weiner M, Burman W, Vernon A, Benator D, Peloquin CA, Khan A, Weis S, King B, Shah N, Hodge T.** Tuberculosis Trials Consortium. Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once-weekly isoniazid and rifapentine. **Am J Respir Crit Care Med.** 2003; 167(10):1341-7.
- Weinshilboum, R.** Inheritance and drug response. **N Engl J Med.** 2003; 348: 529-537.
- Wilson JF, Weale ME, Smith AC, Gratix F, Fletcher B, Thomas MG, Bradman N, Goldstein DB.** Populational genetic structure of variable drug response. **Nature genetics.** 2001; 29:265-269.
- WHO.** World Health Organization Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, financing. WHO report 2008. [who/htm/tb/2008.393](http://who/htm/tb/2008.393). 2008.

- WHO.** World Health Organization. **Tuberculosis program: framework for effective tuberculosis control.** WHO Geneva, Switzerland. WHO/TB/94.179. 1994.
- Xie HG, Xu ZH, Ou-Yang DS, Shu Y, Yang DL, Wang JS, Yan XD, Huang SL, Wang W, Zhou HH.** Meta-analysis of phenotype and genotype of NAT2 deficiency in Chinese populations. **Pharmacogenetics.** 1997; 7(6):503-14.
- Yan L, Beckman RA.** Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development. **Biotechniques.** 2005; 39(4):565-8.
- Yee D, Valiquette C, Pelletier M, Parisien I, Rocher I, Menzies D.** Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2003; 167:1472-7.
- Yew WW, Leung CC.** Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. **Respirology.** 2006;11(6):699-707
- Yimer G, Aderaye G, Amogne W, Makonnen E, Aklillu E, Lindquist L, Yamuah L, Feleke B, Aseffa A.** Anti-tuberculosis therapy-induced hepatotoxicity among Ethiopian HIV-positive and negative patients. **PLoS ONE.** 2008;3(3):e1809.
- Zahrt TC.** Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection. **Microbes Infect.** 2003; 5(2):159-67.
- Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW.** Characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. **Carcinogenesis.** 2007; 28(8):1665-71.
- Zielińska E, Niewiarowski W, Bodalski J.** The arylamine N-acetyltransferase (NAT2) polymorphism and the risk of adverse reactions to co-trimoxazole in children. **Eur J Clin Pharmacol.** 1998; 54(9-10):779-85.

## **9. ANEXOS**

## **ANEXO 1 - Questionário epidemiológico**

Prontuário Nº: \_\_\_\_\_

Quest Nº: \_\_\_\_\_

Questionário epidemiológico

**Nota:** toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será guardado em arquivos fechados. Seu número será a única conexão à informação coletada.

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Telefone de contato: ( ) \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Data da entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Gênero: (M) Masculino (F) Feminino

Cor da pele: (1) branco, (2) mulato-claro, (3) mulato-médio, (4) mulato-escuro, (5) preto, (6) amarelo-claro (7) amarelo-escuro (8) IGN

Profissão: \_\_\_\_\_

Tempo de sintomas; \_\_\_\_\_

Contactante de paciente com TB: (S) Sim (N) Não

Se a resposta da questão 17 for sim:

Quanto tempo: \_\_\_\_\_

BCG: (S) Sim (N) Não (I) IGNORADO

História patológica:

a) Já fumou? ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

a1) Maços- dia: \_\_\_\_\_

b) Você fuma atualmente: ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

c) Hepatopatias(hepatite) ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

d) Diabetes Mellitus (DM) ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

e) Neoplasia maligna ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

f) Uso de corticóide ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

g) Uso de imunossupressores ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

h) Insuficiência renal crônica ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

i) Desnutrição (perda >15% do peso corporal) ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

j) Alcoolismo (critérios CAGE- ver aaixo) ( S ) Sim ( N ) Não ( I )IGN

j1) Qual o tipo de bebida o Sr(a) prefere? ( ) cachaça ( ) cerveja ( ) vinho

( ) whisky ( ) outros ( ) nenhum

**Caso o paciente admita o uso de qualquer bebida citada acima, responda as perguntas abaixo, relacionadas com alcoolismo:**

j2) O sr. (a) tem facilidade de fazer amizades ( S ) Sim ( N ) Não ( I ) IGN

j3) Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ( S ) Sim ( N ) Não ( I ) IGN

j4) Alguém critica ou já criticou o seu modo de beber ( S ) Sim ( N ) Não ( I ) IGN

j5) O sr.(a) costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca ( S ) Sim ( N ) Não ( I ) IGN

j6) O sr. (a) sente-se culpado pela maneira que costuma beber ( S ) Sim ( N ) Não ( I ) IGN

**Caso a resposta tenha sido SIM a pelo menos 02 questões (j3, j4, j5 ou j6), assinale alcoolismo como positivo.**

Tuberculose no passado (S) Sim (N) Não (I)IGN

Número de episódios da doença/desfecho do caso: \_\_\_\_\_

Data do início do tratamento atual: \_\_\_\_\_

R: \_\_\_\_\_ H: \_\_\_\_\_ Z: \_\_\_\_\_

Tipo de tuberculose: ( ) pulmonar ( ) extrapulmonar Qual? \_\_\_\_\_

HIV +: ( S ) Sim ( N ) Não ( I ) IGN ( NR ) Teste Não Realizado

Uso de antiretroviral: ( S ) Sim ( N ) Não ( I ) IGN

Qual (esquema): \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_

Altura: \_\_\_\_\_

IMC: \_\_\_\_\_

Câncer:

Alguém da família tem ou teve câncer? \_\_\_\_\_

Se a resposta for sim, qual o tipo de câncer? \_\_\_\_\_

Toma algum tipo de medicamento: ( ) Sim ( ) Não

Se a resposta for sim, qual? \_\_\_\_\_

Data da próxima consulta: 15d: \_\_\_\_\_ 30d: \_\_\_\_\_ 60d: \_\_\_\_\_

Resultados dos Exames realizados:

PPD: ( 1 ) Reator forte (2) Reator fraco (3) não reator (4) Não realizado (5) IGN

Result.: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

TGO<sub>0</sub>: \_\_\_\_\_ TGO<sub>15</sub> \_\_\_\_\_ TGO<sub>30</sub> \_\_\_\_\_ TGP<sub>60</sub> \_\_\_\_\_

TGP<sub>0</sub>: \_\_\_\_\_ TGP<sub>15</sub> \_\_\_\_\_ TGP<sub>30</sub> \_\_\_\_\_ TGP<sub>60</sub> \_\_\_\_\_

Bilirrubina<sub>0</sub>: \_\_\_\_\_ Bilirrubina<sub>15</sub> \_\_\_\_\_ Bilirrubina<sub>30</sub> \_\_\_\_\_ Bilirrubina<sub>60</sub> \_\_\_\_\_

Hepatite B por PCR: \_\_\_\_\_

Hepatite C por PCR: \_\_\_\_\_

Carga Viral: \_\_\_\_\_

CD4: \_\_\_\_\_

CD8: \_\_\_\_\_

Indicação para quimioprofilaxia: ( ) Sim ( ) Não

Motivo: \_\_\_\_\_

Tratamento atual: Esquema \_\_\_\_\_ Dosagem: R: \_\_\_\_\_ H: \_\_\_\_\_ Z: \_\_\_\_\_

Reações adversas no decorrer do tratamento:

15 dias: \_\_\_\_\_

1º mês: \_\_\_\_\_

2º mês: \_\_\_\_\_

3º mês: \_\_\_\_\_

4º mês: \_\_\_\_\_

5º mês: \_\_\_\_\_

6º mês: \_\_\_\_\_

Genéticos:

NAT2: (1) acetilador rápido (2) acetilador lento

## **ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Número do prontuário: \_\_\_\_\_ Protocolo Nº: \_\_\_\_\_

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

**Projetos:** PROJETO NAT2/ PROJETO SPOLIGOTYPING

Financiamento: CDCT/FEPPS, CNPq

Investigadores Principais: Msc. Patrícia Cafrune / Lia Gonçalves Possuelo

### **Objetivos e relevância do estudo**

O presente estudo tem o objetivo de testar uma metodologia nova para realizar o diagnóstico juntamente com o estudo do bacilo causador da tuberculose. O diagnóstico mais rápido desta doença permite que o tratamento adequado seja iniciado evitando que a doença se espalhe. O estudo dos bacilos é importante para que se tenha um melhor conhecimento da doença e novas estratégias de combate possam ser desenvolvidas

Os efeitos colaterais assim como falha terapêutica (escarro positivo ao final do tratamento) constituem um problema importante na prática do profissional da área da saúde. Sabe-se que estas são causas significativas de hospitalização, de aumento do tempo de permanência hospitalar e, até mesmo, de óbito. Alguns estudos demonstram que certas alterações genéticas podem estar relacionadas com efeitos colaterais ou falha terapêutica. Este trabalho tem como objetivo a caracterização de alterações genéticas em genes envolvidos na metabolização de remédios utilizados no tratamento da TB em amostras de pacientes em tratamento para TB e verificar a existência de uma relação entre os genes com o possível desenvolvimento de efeitos colaterais no fígado.

### **Procedimentos:**

Os voluntários que decidirem participar do estudo serão entrevistados para responderem algumas questões relacionadas à sua saúde, seu perfil sócio-econômico, os fatores de risco que estão associados ao adoecimento por tuberculose, o consumo de bebidas alcoólicas e sintomas atuais. O voluntário será submetido à coleta de 10 mL de sangue que será realizada na face anterior do antebraço com agulha e seringa descartáveis, antecedido por antissepsia local com álcool e algodão além de uma amostra de escarro (na primeira consulta). A amostra de sangue será utilizada para realização da análise genética do gene *NAT2* além de dosagem de TGO, TGP, bilirrubina e teste para hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV). A amostra de escarro será utilizada para análise bacteriológica e pela técnica de *spoligotyping*. Será coletada também uma amostra de sangue (5 mL) na segunda e na terceira consulta, nos dois primeiros meses de tratamento para análise dos níveis enzimáticos durante o tratamento.

### **Local do Estudo**

Os procedimentos de coleta de sangue, escarro e entrevista serão realizados no Laboratório do Hospital Sanatório Partenon em Porto Alegre e as análises genéticas, bacteriológicas, dosagens enzimáticas e teste para hepatites serão realizados no CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS).

### **Riscos e desconfortos**

Os riscos e desconfortos aos participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima. A coleta de sangue é de uma pequena quantidade (10mL) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. A coleta de escarro pode resultar em irritação na garganta caso o paciente tenha que forçá-lo, na falta de ar momentânea e/ou náuseas passageiras. Os demais procedimentos (exames) serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos aos participantes do estudo. Os demais procedimentos (exames) serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos aos participantes do estudo.

### **Desistência na participação do estudo**

A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito. Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia no decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

### **Benefícios**

Os procedimentos médicos aos quais o participante do estudo será submetido poderão gerar novos conhecimentos científicos com conseqüente melhoria do tratamento de pacientes que estiverem contaminados pelo bacilo da tuberculose. Se você desejar poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos nesta pesquisa.

Gostaria de ser comunicado de resultados desta pesquisa?

**Sim, gostaria.**

**Não gostaria** de ser comunicado dos resultados desta pesquisa.

### **Compensação financeira**

Não haverá nenhum pagamento aos indivíduos que concordarem em participar do estudo, bem como os participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

### **Confidencialidade das informações**

Toda a informação que será fornecida pelos participantes do estudo e os resultados dos exames realizados será considerada confidencial e será somente conhecida pela equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código (número) criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo. Este banco será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

### **Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo**

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas poderão ser esclarecidas pela equipe do estudo, através da Msc. Lia Gonçalves Possuelo ou da Msc. Patrícia Izquierdo Cafrune em qualquer momento do estudo pelo telefone: 3352-0336.

### **Em caso de danos**

Se o participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo, o tratamento será fornecido pelo SUS na instituição participante.

**Autorização para estocagem de material biológico:**

1. Permito que minha amostra de sangue seja guardada para ser utilizada em outra pesquisa, mediante protocolo de pesquisa autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS, ficando no entanto livre para solicitar a destruição da mesma, a qualquer momento, se assim desejar; **(sem minha identificação e/ou mantendo minha privacidade).**

- Sim, permito.
- Não permito que minha amostra seja utilizada em novos estudos.
- Desejo que minha amostra seja destruída, após o fim do presente estudo.

2. Gostaria de ser comunicado de resultados que possam interessar-me;

- Sim, gostaria.
- Não gostaria de ser comunicado de novos resultados.

**O significado de sua assinatura**

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

---

Assinatura do voluntário e/ou responsável (se menores de 18 anos)    Data:

---

Assinatura do entrevistador    Data:

---

Assinatura do coordenador do estudo    Data:

**Obs.:** O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.

**ANEXO 3 - Pareceres dos comitês de ética em pesquisa da Escola de Saúde Pública e da FEPPS**



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL  
SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO  
COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA EM SAÚDE  
ESCOLA DE SAÚDE PÚBLICA

**Parecer de Projeto**

Projeto n°

**156/05**

---

**Título do Projeto:**

Estudo de associação de polimorfismo presentes no gene que codifica NAT2 e correlação com hepatotoxicidade em pacientes com tuberculose.

**Autor:** Lia Gonçalves Possuelo

---

**1. Itens de avaliação Ética e Metodológica**

1.1. Título: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

1.2. Autores: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

1.3. Local de Origem: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

1.4. Local de realização: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

1.5. Introdução: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

1.6. Objetivos: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

**1.7. Material e métodos:**

1.7.1. Delineamento de pesquisa: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

1.7.2. Seleção da amostra: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

1.7.3. Cálculo do tamanho da amostra: (X) adequado ( ) comentários ( ) ausente

- 1.7.4. Definição das variáveis:  adequado  comentários  ausente
- 1.7.5. Forma da Avaliação dos Dados:  adequado  comentários  ausente
- 1.7.6. Diretrizes e normas (Resolução 196/96; CIOMS; Resoluções Institucionais):  
 adequado  comentários  ausente
- 1.7.7. Relação Risco-Benefício:  adequado  comentários  ausente
- 1.7.8. Garantia de confidencialidade e privacidade:  
 adequado  comentários  ausente
- 1.8. Cronograma:  adequado  comentários  ausente
- 1.9. Orçamento:  adequado  comentários  ausente
- 1.10. Referências Bibliográficas:  adequado  comentários  ausente
- 1.11. Termo de Consentimento:  adequado  comentários  ausente

**Comentários:**

Consideramos o presente projeto adequado ética e metodologicamente.

Porto Alegre, 25 de agosto de 2005



Nara Regina M. de Castilhos  
Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde  
da ESP/SES/RS

**AVALIAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**5º PARECER DO PROJETO nº10/2005 – CEP-FEPPS/RS**

**PADCT: nº09/2005**

**TÍTULO DO PROJETO:**

**ANÁLISE DOS GENES NAT2 E CYP2E1 E CORRELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE HEPATOTOXICIDADE EM PACIENTES COM TUBERCULOSE.**

**NOME DO PESQUISADOR PRINCIPAL:**

Lia Gonçalves Possuelo

PARECER	
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>APROVADO</b>
<input type="checkbox"/>	<b>APROVADO COM RECOMENDAÇÕES COM PENDÊNCIAS</b>
<input type="checkbox"/>	<b>NÃO APROVADO</b>

**PARECER DO COMITÊ**

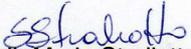
O Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS/RS tendo:

- apreciado e aprovado o presente projeto, em reunião do dia 02/05/2006, Ata nº 09/2006, por estar adequado ética e metodologicamente de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Res.196/96/CNS);
- recebido o cópia da aprovação do projeto pela CONEP (Parecer nº 598/2006).

Este CEP se manifesta favorável ao início da execução do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos, ainda, entrega de relatório parcial de desenvolvimento do projeto até 30/11/2006.

Porto Alegre, 26 de maio de 2006.

  
**Selir Maria Stralotto**  
Coordenadora CEP-FEPPS/RS

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde/FEPPS  
Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS  
Av. Ipiranga, 5400 – Bairro Jardim Botânico – Porto Alegre/RS  
Fones diretos: (51) 32884020/32884096  
e-mail: cep\_fepps@fepps.rs.gov.br

## **ANEXO 4 - Sequência nucleotídica do gene NAT2 e localização dos primers utilizados**

tgtgtttttacgtattttaaatacgttatacctataa **ttagtcacacgaggaaatcaaat**tgctaaagt  
Primer EF →  
 atgatatgtttttatgttttgTTTTtcttgcttaggggatcatggacattg**atgg**acattgaagcata  
 ttttgaagaattggctataagaactctaggaacAaattggacttggaacattaactgacattcttg  
T111C  
 agcaccagatccgggctgttccctt**T**gagaaccttaacatgcattgtgggcaagccatggagttgggc  
C190T  
G191A  
 ttagaggctatTTTTgatcacattgtaagaagaac**CG**gggtgggtggtgtctccaggtcaatcaact  
C282T  
 tctgtactgggctctgaccacaatcggTTTTcagaccacaatgttaggagggtatTTTTa**C**atccctc  
T341C  
 cagttaacaaatacagcactggcatggttcaccttctcctgcaggtg**accaTtgacggcaggaattac**  
G364A Primer IF →  
A411T  
 attgtc**G**atgctgggtctggaagctcctccagatgtggcagcctctagaatt**A**atttctggaagga  
A434C C481T  
 tcagcctc**A**ggtgccttgcattttctgcttgacagaagagagag**ggaatctgggtcTggacca**aatca  
G499A ← Primer IR  
 ggaga**G**agcagtatattacaacaaagaatttcttaattctcatctcctgccaagaagaacaccaa  
G590A  
 aaaatatacttatttacgcttgaacctc**G**aacaattgaagattttgagtctatgaatacatacctgca  
 gacgtctccaacatcttcatttataaccacatcattttgTTccttgagaccccagaaggggttact  
C759T  
 gtttgggtgggcttcatcctcacctatagaaaattcaattataaagacaatacagatctggt**C**gagttt  
A803G  
 aaaactctcactgaggaagaggttgaagaagtgctga**A**aatatatttaagatttccttggggagaaa  
A845G G857A 859del  
T859C  
 tctcgtgccca**A**acctggtgatg**GaT**cccttactatt**tag**aataaggaacaaaataaaccttgtgta  
 tgtatcacccaactcactaattatcaacttatgtgctatcagatacctctctaccctcacgttattt  
← Primer ER  
 tgaagaaaatcctaacaatcaatactt**tcattccataaaaatgtcagcattt**tattaaaaacaataac