



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Polimorfismos nos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e
ABCB11 e hepatotoxicidade induzida pela Isoniazida.

Maria Teresa Penetra Moura de Carvalho

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Polimorfismos nos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *ABCB11* e hepatotoxicidade induzida pela Isoniazida.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva (Universidade de Coimbra).

Maria Teresa Penetra Moura de Carvalho

2012

*Ao avô Beto, e à sua mãe e irmãos que
morreram de tuberculose numa altura
em que a cura ainda estava por descobrir.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva, pela disponibilidade, dedicação, frontalidade e sinceridade que sempre demonstrou.

Ao Dr. Luís Mesquita, pela contribuição neste estudo e pela paciência demonstrada em muitos momentos de grande tensão.

À Dra. Celeste Alcobia, por ter facultado as amostras dos doentes e por toda a contribuição clínica que deu a este estudo.

Ao Dr. Miguel Villar.

Ao Professor Fernando Regateiro pela simpatia e estímulo à investigação científica.

Ao Ricardo, à Patrícia, ao Fernando, à Inês e ao Daniel pelo apoio moral e logístico, e por tantos momentos de descontração.

À Magali, Sofia, Marta e Renata pelos almoços e conversas ao sol que tornaram os meus dias bem mais fáceis. Obrigada pelos conselhos e pela preocupação que sempre demonstraram.

À Ana, Carla e Leonor pela referência que são para mim e por tantos momentos passados. Obrigada pela vossa amizade.

Ao Duarte, por teres estado sempre comigo. Obrigada pela paciência, carinho e alento.

À minha família, pelo apoio incondicional. À Mãe, ao Manel e ao Zé, por terem aguentado tantas conversas sobre este tema.

Ao Pai, por nunca me ter deixado desistir dos meus sonhos e por ter sempre acreditado que “isto” era possível.

RESUMO

A isoniazida (INH) é essencial ao tratamento da tuberculose mas é, igualmente, um dos fármacos mais frequentemente associados a episódios de hepatotoxicidade (HT) graves, por vezes fatais. A suscetibilidade individual a este efeito secundário é um fenótipo multifatorial na dependência de fatores genéticos e não genéticos. A identificação dos fatores genéticos envolvidos pode contribuir para a individualização e otimização da terapêutica.

A variabilidade individual dos níveis séricos da INH é determinada essencialmente por polimorfismos da N-acetiltransferase, codificada pelo gene *NAT2*. A genotipagem do *NAT2* permite a identificação dos vários haplótipos, possibilitando a classificação dos indivíduos em acetiladores lentos (AL), de elevado risco para HT, acetiladores intermédios (AI) e rápidos (AR). Outras enzimas polimórficas intervenientes são o citocromo P-450 2E1 (*CYP2E1*), que converte a INH em metabolitos tóxicos, e as glutatona S-transferases (GST), que para além de contribuírem para o metabolismo da INH também estão envolvidas a resposta do hepatócito à agressão. Assim, a homozigotia para os alelos *wild-type*, de elevada atividade funcional para o gene *CYP2E1* (*CYP2E1 *1A/*1A*), e variantes genéticas com perda de função correspondentes a deleção em homozigotia para os genes *GSTT1* e *GSTM1* poderão constituir genótipos de risco. Fatores genéticos que afetem os sistemas de transporte biliar, como a variante *missense* V444A que confere diminuição da atividade da proteína de transporte de sais biliares (BSEP), codificada pelo gene *ABCB11*, têm sido associados a lesão hepática medicamentosa colestática pelo que também podem estar envolvidos.

Este estudo foi apresentado através de uma comunicação oral no 3º Congresso de Pneumologia do Centro (Carvalho *et al.*, 2012) e teve como principais objetivos: (i) conhecer as frequências dos genótipos de risco dos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *ABCB11* numa população portuguesa de doentes com TB; (ii) verificar a associação entre os genótipos/fatores ambientais de risco e a HT induzida pela INH; (iii) Analisar os possíveis benefícios da individualização da dosagem da INH por genotipagem prévia dos doentes.

O estudo envolveu 109 doentes com tuberculose pulmonar, 31 dos quais com hepatotoxicidade (28.4%) e destes, 16 desenvolveram hepatites tóxicas e/ou foram

sujeitos a transplante hepático (14.68%). Onze polimorfismos do gene *NAT2* foram analisados por sequenciação direta, permitindo a identificação dos vários haplótipos. Os polimorfismos dos genes *CYP2E1* e *ABCB11* foram analisados por PCR-RFLP e as deleções em homozigotia dos genes *GSTT1* e *GSTMI* foram identificadas por PCR-*multiplex*.

Os resultados mostraram que, nenhum dos fatores não genéticos conhecidos, como idade, hábitos alcoólicos ou doença hepática prévia, se correlacionavam com a ocorrência de HT. Com a exceção do gene *GSTT1*, os genótipos de suscetibilidade foram frequentes. Indivíduos com o fenótipo AL (52.29%) apresentam uma suscetibilidade à ocorrência de HT significativamente maior quando comparados com indivíduos AI e AR ($p=0.01$; $OR= 3$; $95\%IC=1.23-7.35$). No entanto, não houve uma associação significativa para os polimorfismos dos genes *CYP2E1*, *GSTMI* e *GSTT1*.

Pela primeira vez, propôs-se mostrar a associação entre a variante V444A, do gene *ABCB11*, e a ocorrência desta complicação, tendo-se verificado uma curiosa relação entre esta variante e a suscetibilidade a HT no sexo feminino, embora sem significado estatístico.

As causas da HT permanecem obscuras, pelo que serão precisos estudos em grandes amostras populacionais que evidenciem a influência genética neste fenótipo complexo. Há, ainda, a necessidade de estudos prospectivos que avaliem a utilidade da genotipagem na previsão deste efeitos adversos e na individualização da dosagem da INH.

Palavras-chave: Isoniazida; hepatotoxicidade; polimorfismos.

ABSTRACT

Isoniazid (INH) is a pivotal agent in the treatment of tuberculosis, but it is also the most prevalent cause of drug-induced hepatotoxicity (HT). Individual susceptibility to drug-induced hepatitis behaves as a multifactorial trait, associated with genetic and non genetic risk factors. The identification of risk genotypes offers the possibility of individualization of INH therapy.

Genetic variants associated with INH metabolism and hepatocyte injury may be implicated. INH plasma concentrations are highly dependent on metabolism via acetylation by the polymorphic enzyme N-acetyltransferase 2, encoded by *NAT2* gene. *NAT2* genotyping, allows the classification of individuals as “fast acetylators” (FA), intermediate acetylators (IA) or “slow acetylators” (SA), the latter with high risk for HT. Polymorphisms in genes encoding other enzymes, like CYP 450 2E1 (*CYP2E1*) or glutathione S-transferases, like *GSTM1* or *GSTT1* are also involved in INH metabolism, and in the case of GSTs, a role in the hepatocyte response to chemical-induced stress cannot be ignored. Homozygotes for wild-type allele of *CYP2E1* gene (**1A/*1A*), responsible of high functional activity, and homozygotes for deletions of *GSTT1* and *GSTM1* genes are relevant genetic risk factors for INH-induced HT. Genetic variants decreasing proteins involved in bile salt transport may also be implicated, as is the case of V444A missense polymorphism in *ABCB11* gene.

This study, presented in an oral communication in 3rd Congress of Pneumology (Carvalho et al., 2012), aimed to: (i) determine the frequencies of risk genotypes in *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* and *ABCB11* in a Portuguese population of TB patients; (ii) investigate the association between risk genotypes/environmental factors and INH-induced HT; (iii) study the possible benefits of genotyping in individualization of INH therapy.

From a total of 109 treated tuberculosis patients, thirty-one have developed HT (28.4%), 16 (14.68%) of them had toxic hepatitis or were subjected to a hepatic transplant. *NAT2* was genotyped by sequencing; polymorphisms in *CYP2E1* and *ABCB11* (V444A) were analyzed by PCR-RFLP assay and homozygous for *GSTM1* and *GSTT1* deletions (*GSTM1**0/*0 and *GSTT1**0*0) were identified using a PCR multiplex assay.

No correlation between non-genetic risk factors and HT was observed. With the exception of *GSTT1* deletion, risk genotypes were frequent in this population. SA patients (52.29%) had an increased risk of HT when compared with IA and RA patients ($p=0.01$; OR= 3; 95%IC=1.23-7.35). However, no significant association was observed for polymorphisms in *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes.

An association between V444A variant, in *ABCB11* gene, and HT was proposed for the first time and a correlation between this variant and risk of HT in females was observed.

The causes of HT remain unclear, so large population studies are needed to show the genetic influence on this complex phenotype. Prospective studies will also be needed to evaluate the usefulness of genotyping in the prediction of adverse effects and in the individualization of INH therapy.

Key-words: Isoniazid; hepatotoxicity; polymorphisms.

LISTA DE ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS

Algumas palavras e expressões que não existem na língua portuguesa foram utilizadas, uma vez que são de difícil tradução, de uso comum na linguagem científica corrente e empregues com o mesmo sentido na língua anglo-saxónica. As unidades de medida foram baseadas na Sistema Internacional de Unidades.

* - colocado após o símbolo/ nome do gene, representando alelo

(+) – colocado após o nome do gene, representando o genótipo positivo para esse gene

(-) – colocado após o nome do gene, representando o genótipo nulo para esse gene

(-) – colocado após a endonuclease representando a ausência de restrição

3' – extremidade hidroxilo livre da cadeia de DNA

5' – extremidade fosfato livre da cadeia de DNA

A - adenina

aa – aminoácido

ATCB - ATP-binding cassette, sub-family B, member 11

ABP - atividade bactericida precoce

AI – acetilação/acetiladores intermédios

AL – acetilação/acetiladores lentos

Ala - alanina

ALT – Alanina aminotransferase

anti-TB – anti-tuberculose

AR – acetiladores rápidos

AST – Aspartato aminotransferase

AUC – área sob a curva

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

BESB - bomba de efluxo de sais biliares

C- citosina

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

C_{MÁX} – concentração máxima

CNV - *Coppy number variation*

CYP – Citocromo P450

CYP2E1 - citocromo P450, subfamília IIE, polipéptido 1

CYP3A4 - citocromo P450, subfamília IIIA, polipéptido 4

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxinucleótidos trifosfato

ddNTPs – didesoxinucleótidos trifosfato

DOTS - *Directly Observed Therapy Short-Course*

DraI – enzima de restrição

EDTA - ácido etileno-diaminotetracético dissódico

EMB - etambutol

fig. – figura

FMOs - mono-oxigenases contendo flavinas

G – guanina

g - grama

GSEC - *International Project on Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens*

GSH- Forma reduzida da glutationa

GST - Glutathione-S-transferase

GSTM1 – Glutathione -S-transferase μ -1 (M-1)

GSTM1 “nulo” – genótipo caracterizado pela inativação de ambos os alelos do gene

GSTT1 – Glutathione *S*-transferase θ -1 (T-1)

GSTT1 “nulo” – genótipo caracterizado pela inativação de ambos os alelos do gene

h - hora

HA3 – *Homologous region 3*

HA5 – *Homologous region 5*

HNF - *Hepatocyte Nuclear Factor*

HT – hepatotoxicidade

IC – Intervalo de confiança de 95%

INH – isoniazida

InhA - *proteína reductase transportadora de enoil-acil*

KasA - *β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase*

KatG – catalase-peroxidase micobacteriana

Kb - kilobases

Locus – determinado local em que se encontra um gene num cromossoma

Loci – forma plural de locus

M – molar

MIC - Concentração Inibitória Mínima

MBC - Concentração Bactericida Mínima

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

N/n – número de indivíduos

NADH - dinucleótido de nicotinamida-adenina

NAT - *N*-acetiltransferase

NAT2 - *N*-acetiltransferase 2

ng – nanograma

nm - nanómetro

°C – graus centígrados

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds ratio* (termo estatístico que traduz o risco conferido por uma determinada condição, calculado por estudos retrospectivos; > 1 risco aumentado, < 1 risco diminuído, = 1 igual risco).

p – probabilidade de um erro estatístico do tipo 1

pb – pares de bases.

PBS – tampão fosfato salino

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PNT - Nacional de Luta contra a Tuberculose

Primer – oligodesoxirribonucleótido utilizado em reacções de PCR para iniciar a polimerização.

*Pst*I – enzima de restrição

PXR – *pregnane x receptor*

PZA - pirazinamida

□X174/HaeIII - Plasmídeo □ X174 digerido com a enzima de restrição nº 3 com origem na *Haemophilus aegyptius*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIF – rifampicina.

ROS – espécies reactivas de oxigénio

*Rsa*I – enzima de restrição

rpm – rotações por minuto

s - segundo

SDS - dodecil sulfato de sódio

SLAT – Serviço de Luta Anti-tuberculosa

SNPs – *single nucleotide polymorphisms*

Splicing – processamento do RNA mensageiro, por remoção de sequências intrónicas.

SULT - sulfotransferases

T – timina

TAE – tampão tris acetato

Taq DNA polimerase - Polimerase termoresistente do DNA derivada do *Thermus aquaticus*

TB – tuberculose

TBMR – tuberculose multi-resistente

TBXDR - TB extensivamente resistente

TBE - Solução tampão tris-borato

TGP - transaminase glutâmico pirúvica

TGO – transaminase oxalacética

T_{MÁX} – Tempo máximo

U – unidades

UE – União Europeia

UGT - UDP-glucuronosiltransferases

U.V. – ultra-violeta

µL – microlitro

µM – micromolar

Val - valina

Varição *missense* - substituição de um aminoácido por outro

VHC – vírus

VIH – vírus da imunodeficiência humana

χ^2 – Qui-quadrado

wild-type – genótipo selvagem para uma variante genética

INDICE

1. Introdução	19
1.1. A Farmacogenómica e medicina personalizada	19
1.2. A Tuberculose: o problema de saúde pública.....	21
1.2.1. A infeção.....	21
1.2.2. A situação mundial	21
1.2.3. A situação em Portugal	23
1.2.4. Esquemas terapêuticos e de prevenção	25
1.3. A Isoniazida.....	28
1.4. Hepatotoxicidade induzida pela INH	34
1.4.1. A enzima NAT2 e o gene NAT2.....	37
1.4.2. A enzima CYP2E1 e o gene CYP2E1.....	43
1.4.3. A enzima GST e os genes GSTT1 e GSTM1.....	48
1.4.4. Gene ABCB11.....	52
1.4.5. Outros fatores	54
1.5. Objetivos	56
2. Materiais e métodos	57
2.1. Descrição da população.....	57
2.2. Extração de DNA	58
2.3. Quantificação do DNA.....	59
2.4. Genotipagem do NAT2	60
2.5. Genotipagem do gene CYP2E1	62
2.6. Genotipagem dos genes GSTT1 e GSTM1	64
2.7. Genotipagem do gene ABCB11	68
2.8. Análise estatística.....	70
3. Resultados e discussão	71
3.1. Caracterização da população	71
3.2. Fatores genéticos	72
3.2.1. Gene NAT2	73
3.2.2. Gene CYP2E1	76
3.2.3. Genes GSTM1 e GSTT1.....	79
3.2.4. Gene ABCB11.....	82
3.3. Hepatotoxicidade em doentes sem genótipo de risco	84
3.4. Ausência de hepatotoxicidade em doentes com o genótipo de risco	87
3.5. Conclusões e perspetivas futuras.....	89
4. Bibliografia.....	92
5. Anexos.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Taxas de incidência da tuberculose por país, 2009.	22
Figura 2 - Incidência de casos novos de TB notificados por 100 mil habitantes.	24
Figura 3 - Vias de metabolização da INH.	32
Figura 4 - Concentração plasmática de INH.	33
Figura 5 - Correlação entre o déficit funcional da enzima NAT2 e risco de HT.	36
Figura 6 - Conjugação da glutathiona.	48
Figura 7 - Estrutura dos loci dos genes GSTM e GSTT.	50
Figura 8 - Apoptose do hepatócitos induzida por ácidos biliares.	52
Figura 9 - Eletroferograma de sequenciação do gene NAT2.	61
Figura 10 - Locais de restrição para as enzimas <i>RsaI</i> e <i>DraI</i> .	62
Figura 11 - Perfis de RFLPs dos polimorfismos do gene CYP2E1.	64
Figura 12 - PCR multiplex para os genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> .	65
Figura 13 - Representação esquemática da amplificação do fragmento de 1460 pb resultante da deleção de 54 kb que contém o gene GSTT1.	66
Figura 14 - Resultado de PCR que permite distinguir os homozigotos para a presença do gene dos heterozigotos para a deleção.	66
Figura 15 - Local de restrição para a enzima HaeIII.	68
Figura 16 - Identificação do polimorfismo 1457 T>C do gene ABCB11 por RFLP.	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Alelos do gene <i>NAT2</i>	39
Tabela II - Exemplos de estudos em que se correlaciona o fenótipo de acetilação, obtido a partir de genotipagem do <i>NAT2</i> , com a ocorrência de HT.	42
Tabela III - Alelos do gene <i>CYP2E1</i>	44
Tabela IV – Correspondência entre as diversas nomenclaturas para os alelos do gene <i>CYP2E1</i> .	46
Tabela V - Tabela de referências que correlacionam os genótipos <i>CYP2E1</i> com a presença de HT.	47
Tabela VI - Frequências alélicas das deleções <i>GSTT1*0</i> e <i>GSTM1*0</i> em caucasianos e asiáticos	49
Tabela VII - Tabela de referências que correlacionam a deleção do <i>GSTT1</i> com a presença de HT.	51
Tabela VIII - Tabela de referências que correlacionam a deleção do <i>GSTM1</i> com a presença de HT.	51
Tabela IX - Características da população de doentes.	57
Tabela X – Classificação do grau de HT	58
Tabela XI - Primers utilizados para a PCR inicial e para a PCR de sequenciação	60
Tabela XII - Primers utilizados para as PCRs.	63
Tabela XIII - Primers utilizados nas PCRs.	68
Tabela XIV - Primers utilizados para a PCR.	69
Tabela XV – Características das populações de doentes com e sem HT.	72
Tabela XVI – Frequências genotípicas do <i>NAT2</i> em doentes com e sem HT.	74
Tabela XVII - Frequências fenotípicas do <i>NAT2</i> em doentes com e sem HT.	75

Tabela XVIII – Frequências genótípicas dos polimorfismos do <i>CYP2E1</i> em doentes com e sem HT.	78
Tabela XIX – Frequências genótípicas dos polimorfismos do <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> em doentes com e sem HT.	81
Tabela XX - Frequências genótípicas do polimorfismo 1331 T>C do gene <i>ABCB11</i> em doentes com e sem HT.	83
Tabela XXI - Frequências genótípicas do polimorfismo 1331 T>C do gene <i>ABCB11</i> em doentes com e sem HT.	84
Tabela XXII - Características dos doentes com fenótipo AI, com e sem HT.	85
Tabela XXIII – Associação dos genótipos dos <i>CYP2E1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>ABCB11</i> com a presença ou ausência de HT em doentes com o fenótipo AI	86
Tabela XXIV - Características dos doentes com fenótipo AL, com e sem HT.	88
Tabela XXV – Associação dos genótipos dos genes <i>CYP2E1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>ABCB11</i> com a presença ou ausência de HT em doentes com o fenótipo AL.	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Farmacogenómica e medicina personalizada

As diferenças inter-individuais na resposta aos fármacos, relativamente a eficácia e reações adversas, resultam não só de fatores como a idade, sexo, interferência de doença ou da interação medicamentosa, mas também de fatores genéticos. A farmacogenómica é uma nova área interdisciplinar que estuda, precisamente, o papel da hereditariedade na variabilidade individual na resposta a fármacos, e tem como principais objetivos não só a seleção do fármaco e da dose adequados para cada doente (Weinshilboum, 2003), como também a descoberta de novos alvos terapêuticos.

O conceito inicial de farmacogenética teve origem em observações médicas de doentes que apresentavam concentrações de fármacos elevadas ou baixas, quer no sangue quer na urina, e no reconhecimento de que os fatores bioquímicos que levavam a essas variações eram hereditários. O termo farmacogenómica é recente, da era “omics”, e inclui estudos globais do genoma e de expressão génica, possíveis graças às novas tecnologias de *microarrays* e sequenciação de nova geração.

Os fatores farmacogenómicos atuam a níveis farmacocinéticos e farmacodinâmicos, que são os dois principais componentes da curva dose/resposta de um fármaco. Quando um fármaco é administrado oralmente, ele passa pela absorção, pela distribuição, pelo metabolismo e, finalmente, pela excreção. A farmacogenómica tem, portanto, implicações em cada um destes passos (Wang *et al*, 2005), principalmente no metabolismo, uma vez que as diferenças na biodisponibilidade do fármaco são sobretudo causadas por enzimas polimórficas envolvidas no seu

metabolismo, e, em menor grau, por polimorfismos de transportadores. A variabilidade interindividual na relação dose/resposta de um indivíduo, também pode ser influenciada por polimorfismos nos genes que codificam os próprios alvos terapêuticos, correspondendo a uma interferência ao nível farmacodinâmico.

A farmacogenômica trouxe um novo alento à medicina personalizada, com a possibilidade de selecionar o fármaco e a dose adequados ao genótipo de cada indivíduo, prometendo maior sucesso terapêutico e diminuição da toxicidade (Wang, 2010). No entanto, a repercussão clínica da caracterização do genótipo constitucional na seleção da dose é praticamente nula. As dificuldades advêm de vários fatores, sobretudo do caráter poligênico do metabolismo de muitos fármacos. Esta condição associa-se a uma variação contínua da expressão fenotípica (seguindo uma distribuição Gaussiana) e dificulta a identificação dos *loci* envolvidos e o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo clinicamente útil.

Outros fatores que condicionam a aplicação da farmacogenômica na clínica são, por exemplo, a baixa frequência das variantes de risco, a adaptação da dose poder ser feita por avaliação de parâmetros clínicos (por exemplo frequência e ritmo cardíaco) e laboratoriais (por exemplo provas de coagulação), a existência de fármacos alternativos, os elevados custos da genotipagem e, sobretudo, a inexistência de estudos prospectivos que comprovem a utilidade da individualização da terapêutica com base na genotipagem do doente.

1.2. A Tuberculose: o problema de saúde pública

1.2.1. A infecção

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa provocada pela *Mycobacterium tuberculosis*. Esta micobactéria pode ter como alvo os pulmões, mas também pode afetar outras partes do corpo, como a pleura, o pericárdio, a mama, a pele, a laringe, o sistema nervoso central, o sistema linfático, o sistema genito-urinário, o ossos e as articulações (Sharma & Mohan, 2004). A transmissão deste bacilo processa-se pelo ar, através da respiração, tosse e espirro, ou através da saliva (OMS).

A TB é a principal causa de morte provocada por uma doença infecciosa curável e a principal causa de morte dos doentes com SIDA.

1.2.2. A situação mundial

A TB ressurgiu como uma ameaça para a saúde pública mundial devido ao aumento do número de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes e ao crescente número de doentes com VIH (Huang *et al.*, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2009, existiam cerca de 9.4 milhões de casos em todo o mundo (figura 1) e que, no mesmo ano, 1.7 milhões de pessoas morreram com esta doença. O maior número de novos casos terá ocorrido no sudeste asiático e contam para 33% da incidência mundial. As taxas de incidência estimadas nos países da África Subsaariana ultrapassam os 1000 casos por cada 100 000 habitantes, constituindo as taxas de incidência *per capita* mais elevadas (Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose, PNT, Março 2011).

A UE contava, em 2009, com uma incidência de 15.8/100 mil habitantes (79665 casos). Numa análise de 2008, o índice de sucesso terapêutico da região Europa da OMS era dos mais baixos, não passando dos 80% (PNT, 2011).

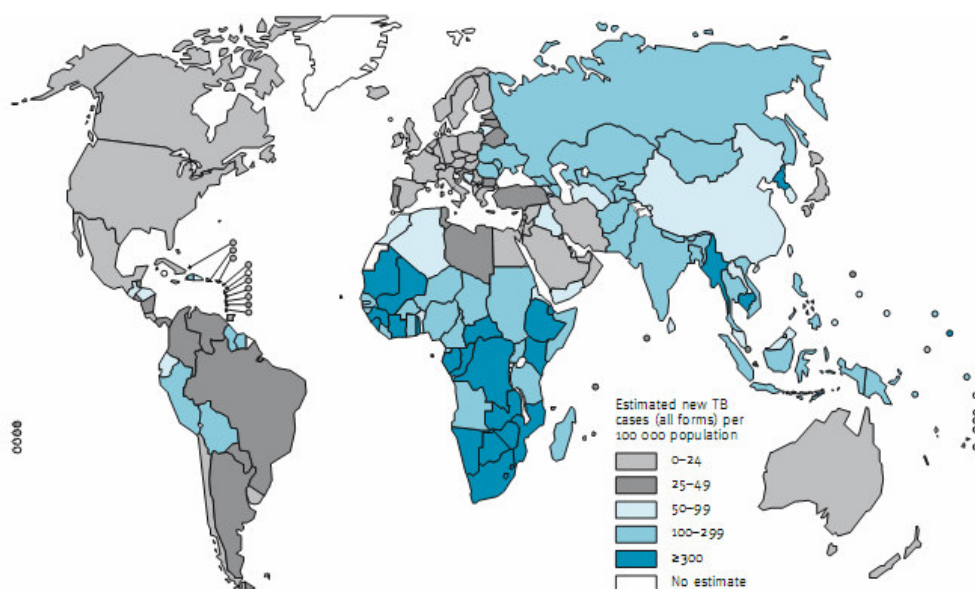


Figura 1 - Taxas de incidência da TB por país, 2009 (Adaptado de *Global Tuberculosis Control: a short update to the 2010 report*, OMS).

Em 2006, a OMS lançou a Estratégia Stop Tuberculose. O núcleo desta estratégia é o DOTS (*Directly Observed Therapy Short-Course*), lançado pela OMS em 1995. Estes serviços permitem uma maior acessibilidade e qualidade, adotam algumas inovações no sentido do compromisso com profissionais de saúde privados, promovem a mobilização de pessoas e comunidades afetadas, ajudam a fortificar os sistemas de saúde e promovem a investigação. Desde este lançamento, 41 milhões de doentes foram tratados com a estratégia DOTS. A taxa de incidência *per capita* atingiu o seu valor máximo em 2004 ($143/10^{-5}$), e desde então tem decrescido, o que significa que o mundo está em vias de atingir uma das metas dos “*Millennium Development Goals*”, que tem

como objetivo parar e inverter a incidência de TB e de outras doenças, como a malária, em 8 das 9 sub-regiões epidemiológicas da OMS (PNT, 2011).

A estratégia DOTS está ameaçada pela emergência de formas de doença com multi-resistência (TBMR). A TBMR é uma forma particularmente perigosa, que é definida como sendo uma doença causada por um bacilo resistente a pelo menos 2 fármacos de 1ª linha. Estima-se que em cada ano surjam 440 mil novos casos de TBMR, sendo que a proporção do total de casos com multirresistência na UE, em 2009, foi 5.3% (menos 0,7 pontos percentuais do que em 2008) (PNT, Março 2011). A MR poderá ser causada por um tratamento parcial ou inconsistente, quando os doentes não tomam os medicamentos regularmente pelo período requerido porque se sentem melhor, porque os médicos e outros profissionais de saúde prescrevem o tratamento errado, ou porque o fornecimento do fármaco é incerto.

Uma vez que as defesas contra a *M. tuberculosis* dependem da imunidade mediada por células, a infeção pelo VIH tornou-se um dos principais fatores de risco de progressão da TB (Duarte *et al.*, 2007). Em 2009, dos 9,4 milhões de casos de TB, 1 a 1.2 milhões estavam co-infetados pelo VIH (PNT, Março 2011).

1.2.3. A situação em Portugal

Apesar de Portugal se incluir nos países de incidência intermédia/baixa de TB, permanece o país da Europa Ocidental com maior incidência. Contudo, esta tem diminuído consistentemente, verificando-se um decréscimo anual médio de 6.4%, nos últimos 10 anos. É uma tendência que converge para a média europeia e aproxima Portugal da fasquia dos 20 casos por 100 mil habitantes, limite que define os países de

baixa incidência. No contexto da UE, Portugal é dos países com o ritmo de decréscimo mais acentuado.

Regiões de alta incidência e os distritos Viana do Castelo, Vila Real, Bragança, Setúbal, Faro, Lisboa e Porto passaram a ser de incidência intermédia (figura 2). Apesar da prevalência dos principais fatores de risco, este declínio reflete o impacto que as medidas de controlo estão a ter.

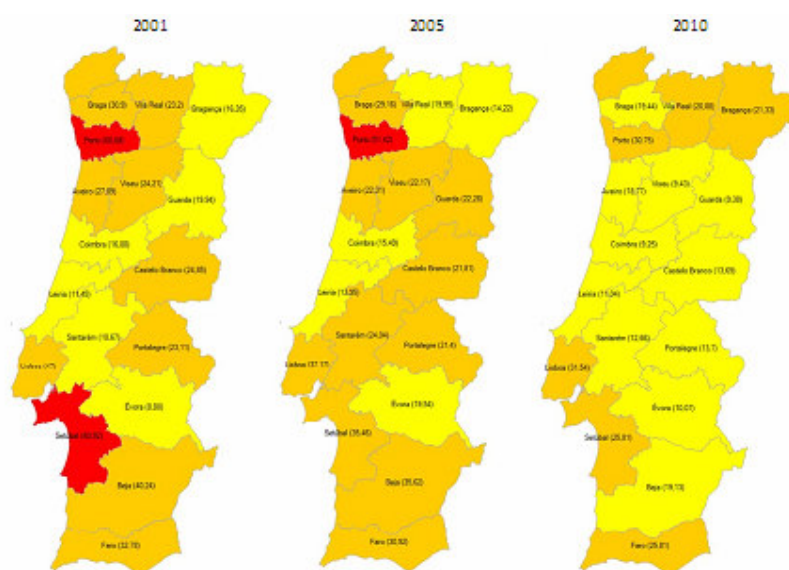


Figura 2 - Incidência de casos novos de TB notificados por 100 mil habitantes: distribuição geográfica e evolução desde há 10 anos (2001 à esquerda, 2005 ao centro e 2010 à direita). Distritos com alta incidência (>50/100 mil) a encarnado, incidência intermédia (>20 <50/100 mil) a laranja e distritos com baixa incidência (<20/100 mil) a amarelo. A Região Autónoma da Madeira tem <20/100 mil (amarelo) de 2001 a 2010. A Região Autónoma dos Açores tem >20/100 mil (laranja) em 2001 e 2005, e <20/100 mil (amarelo) em 2010 (Adaptado de PNT, Março 2011).

Contudo, e como já foi referido, o sucesso da estratégia DOTS pode ser afetado pelo aparecimento de multirresistências. A emergência de casos de TBMR em Portugal tem maior expressão na região de Lisboa e Vale do Tejo, mas tem vindo a diminuir, e a

incidência é inferior à média dos países da Europa Ocidental (1,5% dos casos de TB notificados e testados em 2009). Entre os casos de TBMR, tem sido muito elevada a proporção de casos de tuberculose extensivamente resistente (TBXDR), uma forma de tuberculose causada por uma bactéria que é resistente a alguns dos fármacos anti-TB mais eficazes, ou seja, as formas mais graves. Portugal, a Estónia e a Letónia, são os países onde existem maiores percentagens de TBXDR.

Em Portugal, a infeção por VIH, a toxicodependência, o alcoolismo, a reclusão, e a situação de sem abrigo são os principais fatores de risco para a doença. A infeção pelo VIH é o fator de risco mais importante com uma prevalência de 11% entre os casos de TB. No contexto da UE, Portugal é o país com a maior prevalência de VIH nos casos de TB, com 15% (em 2009). Contudo, em mais de 65 % dos casos de TB não há fatores de risco identificados, o que está de acordo o elevado potencial de transmissão desta infeção na comunidade.

1.2.4. Esquemas terapêuticos e de prevenção

Mycobacterium tuberculosis tem a capacidade de entrar em períodos de latência com atividade metabólica limitada, o que dificulta a ação dos antibióticos (Coll, 2003). A existência de populações bacterianas heterogéneas e de mutantes naturais torna obrigatório o recurso a uma terapêutica combinada, para evitar a seleção de mutantes resistentes.

A TB tem um tratamento eficaz que assegura, nos casos mais simples, uma taxa de sucesso de 95% (García *et al.*, 2003). O tratamento deve ser suficientemente prolongado para que seja garantida a eliminação de todas as populações de bactérias: extracelulares e intracelulares, com alta ou baixa atividade metabólica (Coll, 2003).

A fase inicial, que tem como objetivo encurtar o período de infecção e contágio, apresenta uma duração de 2 meses e é constituída por um esquema padrão com quatro fármacos de primeira linha: isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) rifampicina (RIF) e etambutol (EMB). Após a administração oral, estes fármacos são bem absorvidos, atingindo níveis séricos máximos em duas a quatro horas, e sendo eliminados quase completamente em 24h. São recomendados com base na sua atividade bactericida precoce (ABP, sendo a capacidade de reduzir rapidamente o número de microrganismos viáveis e tornar os pacientes não infecciosos), na sua atividade de esterilização (capacidade de matar todos os bacilos, evitando recidivas) e na sua capacidade de prevenção de resistência (Fauci *et al.*, 2008). Em 80 a 90% dos casos, a cultura bacteriana torna-se negativa nos primeiros 2 meses (Domínguez-castellano *et al.*, 2007). A segunda fase da terapêutica, de manutenção ou continuação, dura 4 meses e tem como objetivos eliminar todos os bacilos intracelulares e evitar as recidivas (Vidal *et al.*, 2002; Caminero, 2003).

A duração total do tratamento será de 6 meses e o esquema terapêutico aplica-se a praticamente todas as formas de tuberculose, tanto em adultos como em crianças. Contudo, poderá prolongar-se até aos 7 meses nos casos em que as culturas dos bacilos permanecem positivas para além dos primeiros 2 meses ou em situações especiais como uma infecção por VIH (Domínguez-Castellano *et al.*, 2007). A administração pode ser diária (7 a 5 dias por semana), trissemanal ou bissemanal, e sempre que praticável seguindo a estratégia DOTS. De acordo com Duarte *et al.* (2007) a duração do tratamento deveria ser de 9 meses, usado em regime diário ou bissemanal, uma vez que o tratamento durante 6 meses faz descer a proteção para 70%.

O tratamento tem vários objetivos: a cura, evitar recidivas e a morte, interromper a transmissão e prevenir o aparecimento de resistências secundárias.

A prevenção é a arma mais poderosa e genericamente usada em todo o mundo. Existem três estratégias clássicas para a prevenção da tuberculose: através da vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin); através do rastreio, e através da quimioprofilaxia primária e secundária. A vacina é aplicada nos primeiros 30 dias de vida e capaz de proteger contra as formas mais graves da doença. O rastreio deve ser feito pelos Serviços de Saúde, devendo estes não só observar as pessoas com sintomas que procuram os Serviços, mas também tomar as medidas necessárias para encontrar indivíduos que apesar de sintomáticos, não os procuram. A quimioprofilaxia primária (ou quimioprevenção) consiste numa toma diária de isoniazida nas doses terapêuticas (5 mg/kg) e é aplicada a indivíduos não infetados em contacto próximo com doentes com TB pulmonar com baciloscopia positiva. A quimioprofilaxia secundária visa evitar que as pessoas já infetadas (com TB latente) evoluam para uma situação de doença.

A terapêutica combinada da tuberculose expõe o doente a efeitos secundários, dos quais os mais graves são a hepatotoxicidade (HT), potencialmente fatal, e a neuropatia periférica. Apesar de uma terapia combinada com 4 fármacos diminuir a probabilidade do aparecimento de resistências, sabe-se que aumenta a incidência de toxicidade medicamentosa para 35% (Zand *et al.*, 1993; Maffei & Carini, 1980; Nishimura *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2000), sobretudo no caso da combinação de INH com RIF. A INH, como veremos mais à frente, é o único com uma farmacocinética compatível com um fenótipo monogénico, e portanto com possível indicação para genotipagem como apoio à decisão terapêutica.

Para prevenir as complicações, antes de iniciar o tratamento, todos os doentes devem ser avaliados clinicamente, devendo a avaliação incidir sobre a existência de doença hepática prévia ou atual, hábitos alcoólicos e toma concomitante de outros

fármacos (Duarte *et al.*, 2007). Durante o tratamento dever-se-á assegurar o controlo da função hepática através da avaliação do nível sérico das transaminases.

1.3. A Isoniazida

A isoniazida (INH) é hidrazida do ácido isonicotínico, uma pequena molécula hidrossolúvel que penetra facilmente na célula. Pertence ao grupo farmacoterapêutico dos medicamentos anti-infecciosos, antibacterianos e anti-tuberculosos, existindo sob a forma de comprimidos de 50, 100 e 300 mg, xarope e suspensão oral (recomendado a crianças). Existem também formas farmacêuticas combinadas (cápsulas de 100 mg de isoniazida + 150 mg de rifampicina e de 200 mg de isoniazida + 300 mg de rifampicina).

Cinquenta anos após a sua descoberta, a INH é um agente potente e altamente seletivo que continua a ser uma peça central na terapia da tuberculose (Youatt, 1969; Deretic *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996).

Este fármaco, por si só, não é tóxico para a bactéria, mas atua como um pró-fármaco, que é ativado pela enzima bacteriana KatG (Zhang *et al.*, 1992), uma peroxidase-catalase multifuncional que tem outras atividades incluindo a de peroxinitritase (Wengenack *et al.*, 1999) e de oxidase do NADH (Singh *et al.*, 2004).

A KatG favorece a complexação do ácido isonicotínico com NADH. Este complexo liga-se à *proteína reductase transportadora de enoil-acil*, InhA, bloqueando a síntese do ácido micólico, componente da parede celular específico da micobactéria. Outro possível alvo da INH seria a β -cetoacyl-ACP (KasA sintetase), uma enzima

igualmente envolvida na síntese dos ácidos micólicos. Durante a ativação da INH pela KatG formam-se radicais livres de oxigénio como o ião superóxido (Ghiladi *et al.*, 2005), peróxido de hidrogénio (Zhao *et al.*, 2006) e óxido nítrico (Timmins GS, 2004) que também poderão contribuir para a ação bactericida da INH.

Em 40-58% das estirpes resistentes à INH encontram-se mutações no gene *KatG*, sendo a mutação mais prevalente a Ser315Thr (40%). A mutação interfere com a ligação da enzima à INH, mas mantém 50% da sua atividade catalase-peroxidase. Assim, uma catalase-peroxidase alterada e a conservação de alguma capacidade protetora contra a oxidação induzida pela INH vai promover uma elevada resistência do bacilo àquele fármaco (Rouse *et al.*, 1996). Em estirpes com baixos níveis de resistência também foram descritas mutações dos genes da *InhA* e da *KasA*, embora o seu significado funcional permaneça controverso (Lee *et al.*, 1999).

A INH atua como bactericida contra microrganismos em multiplicação rápida, tanto extracelulares como intracelulares, mas como bacteriostático contra bacilos com uma divisão lenta. Assim, a INH elimina a maior parte da população de *Mycobacterium tuberculosis* que representa bacilos na fase de crescimento exponencial (Gumbo *et al.*, 2007), mas o efeito bactericida cessa ao fim de 2 a 3 dias de terapêutica, com a diminuição da taxa de divisão bacilar. A sua ação é medida usando o índice de “Atividade Bactericida Precoce” (ABP) que consiste na taxa média de declínio do número bacilos presentes na expectoração durante os primeiros dois dias de terapia (Donald *et al.*, 2003; Jindani *et al.*, 1980; Peloquin, 2002).

A ABP da INH é detetável numa dose diária total de 18 mg, atingindo a fase *plateau* com uma dose diária única de 150 a 300 mg/dia. Num estudo de Donald *et al.* (2004) determinou-se que a ABP era máxima em concentrações séricas de INH de 2 a 3 µg/ml. Por ter uma ABP incomparável, a INH é o agente mais eficaz para a prevenção

da resistência a fármacos (Mitchison, 1979). Outra característica favorável é o facto de a “Concentração Inibitória Mínima” (MIC) e a “Concentração Bactericida Mínima” (MBC) da INH serem extremamente baixas, de 0.025 a 0.05 ng para *Mycobacterium tuberculosis* (Heifets, 1991).

O efeito anti-bacteriano da INH parece estar relacionado com a área sob a curva (AUC) que descreve a concentração em função do tempo (Kinzig-Schippers, 2005), e com a concentração plasmática máxima do fármaco (Donald *et al.*, 2004), ambas dependentes do metabolismo do fármaco.

A INH é absorvida rapidamente pelo trato intestinal, atingindo a concentração máxima ($C_{MÁX}$), em jejum, de 3 a 5 $\mu\text{g/ml}$, 1 ou 3h após uma dose diária de 300 mg, e um pico de 9 a 15 $\mu\text{g/ml}$ após uma dose bissemanal de 900 mg (Peloquin *et al.*, 1997; Peloquin *et al.*, 1999). Uma dieta rica em gorduras tem efeitos significativos, reduzindo a $C_{MÁX}$ (-51%) e aumentando o $T_{máx}$ (+89%) (Peloquin *et al.*, 1999), razão pela qual este fármaco dever ser administrado em jejum.

Apesar de serem reconhecidos vários fatores potencialmente determinantes da variabilidade da concentração de um fármaco (Kimerling, *et al.*, 1998; McIlleron *et al.*, 2002; Polasa *et al.*, 1984; Van Crevel *et al.*, 2002), eles estão pouco caracterizados em populações de doentes com TB. Alguns estudos demonstraram que as concentrações dos fármacos anti-TB podem, em algumas circunstâncias, depender do consumo de álcool (Kimerling, *et al.*, 1998), da existência de subnutrição (Polasa *et al.*, 1984), do género (Ray *et al.*, 2003; Van Crevel *et al.*, 2002) e da idade (McIlleron *et al.*, 2006). Estes estudos permitiram concluir que as concentrações de INH e RIF em doentes do sexo feminino eram mais elevadas do que em doentes masculinos, e que doentes mais idosos também apresentavam níveis mais elevados de INH, o que não é surpreendente uma vez que é esperada, com o envelhecimento, uma redução da atividade das vias

metabólicas e excretoras. A absorção de fármacos anti-micobacterianos está diminuída nos doentes com SIDA (Conte *et al.*, 2002).

A maioria dos fármacos usados na TB é lipossolúvel e a sua eliminação requer uma biotransformação em compostos mais hidrossolúveis. A biotransformação é assegurada pelas enzimas hepáticas da fase I e II do metabolismo de xenobióticos. Na fase I, ocorre a oxidação, redução ou hidrólise, onde há a conversão dos fármacos em metabolitos mais hidrofílicos, que podem ser menos ativos, ou, no caso pró-fármacos, mais ativos. As reações de tipo I são mediadas principalmente pelos citocromos P450 (CYPs) e, em menor grau, pelas mono-oxigenases contendo flavinas (FMOs).

Numa reação da fase II o produto da biotransformação de fase I é conjugado, resultando metabolitos geralmente não tóxicos que podem ser facilmente eliminados. Nesta fase, pode estar envolvido um largo número de famílias enzimáticas, incluindo as UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), sulfotransferases (SULTs), *N*-acetiltransferases (NATs) e glutathione *S*-transferases (GSTs) (Crettol *et al.*, 2010). Os transportadores, como a P-glicoproteína também desempenham um papel crítico na eliminação dos fármacos e dos seus metabolitos, pelo que estes processos são por vezes designados de fase III do metabolismo (Kliwer *et al.*, 2002).

A figura 3 mostra as várias vias de metabolização da INH. Esta é inicialmente metabolizada por acetilação pela *N*-acetiltransferase 2 (NAT2) (Mitchell *et al.*, 1976), uma enzima responsável pela acetilação de vários xenobióticos ou fármacos que contêm arilamina ou hidrazina (Meyer & Zanger, 1997), como sejam o nitrazepam, a hidralazina ou as sulfonamidas. Da metabolização da INH pela NAT2 resulta o metabolito acetil-isoniazida, rapidamente hidrolisado em acetil-hidrazina. Esta, por sua vez, pode ser novamente acetilada pela NAT2 na inofensiva diacetil-hidrazina (Lauterburg *et al.*, 1985) ou hidrolisada originando hidrazina, um intermediário

potencialmente tóxico. A toxicidade da hidrazina deve-se fundamentalmente à sua oxidação pelo citocromo P4502E1 (CYP2E1), de onde resulta a formação de espécies reativas de oxigénio (Tafazoli *et al.*, 2008).

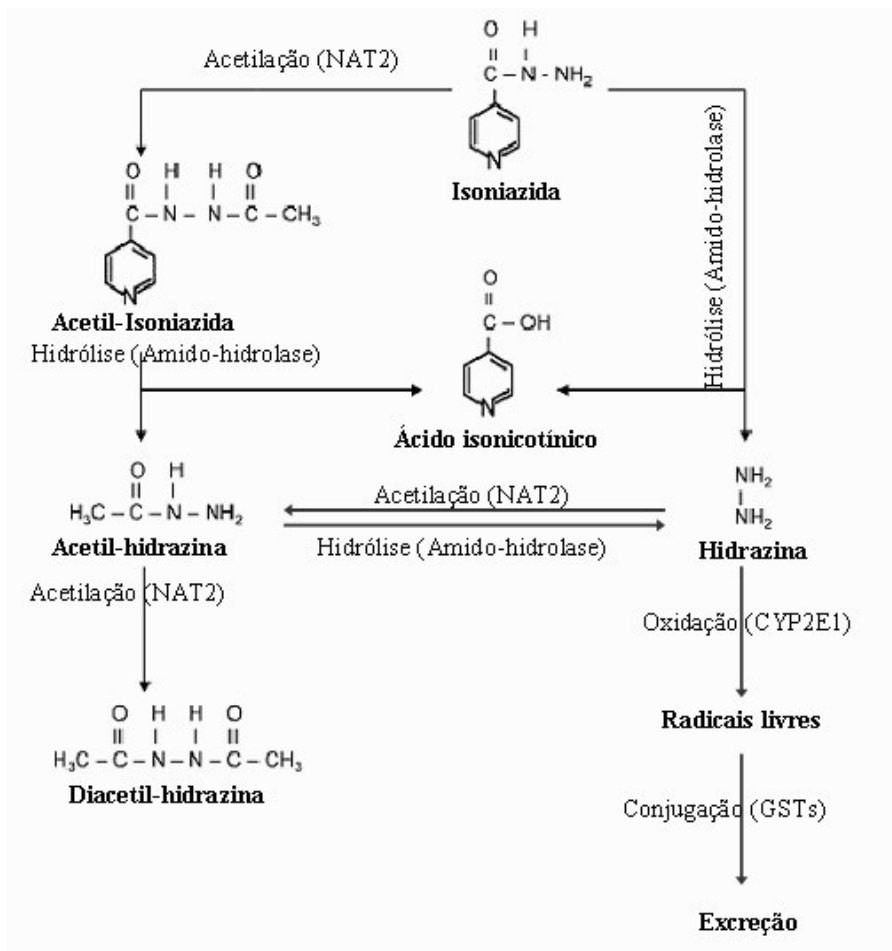


Figura 3 - Vias de metabolização da INH. Nestas vias estão envolvidas as enzimas NAT2, CYP2E1 e GSTs (Adaptado de Yue et al, 2009).

A eliminação de INH segue uma distribuição bimodal, (trimodal segundo alguns autores) (figura 4), correspondendo à existência de grupos de indivíduos com fenótipos de metabolização distintos na população: rápidos (AR), intermédios (AI) e lentos (AL). Esta situação é típica de um fenótipo de metabolização de tipo monogénico, dependente de polimorfismos funcionais de uma enzima com efeito major sobre o metabolismo do

fármaco. De facto, as concentrações séricas e ABP da INH dependem, essencialmente da NAT2 (Donald *et al.*, 2004; Deguchi *et al.*, 1990; Parkin *et al.*, 1997).

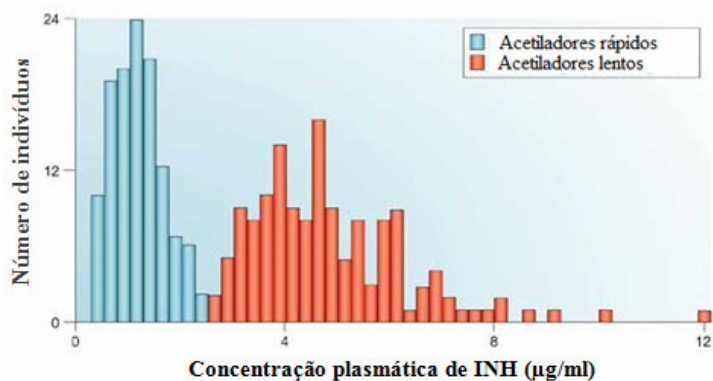


Figura 4 - Concentração plasmática de INH em 267 indivíduos, 6 horas depois da administração de uma dose oral idêntica. A distribuição bimodal resulta da existência de polimorfismos no gene NAT2 (Adaptado de Wang *et al.*, 2010).

Em Caucásios, a frequência de indivíduos com o fenótipo de AL é quase de 50% (Ohno *et al.*, 2000) e, um estudo de Lemos & Regateiro (1998) na população Portuguesa, por genotipagem, determinou que esta frequência atingia os 64.1%, constituindo uma das frequências mais elevadas alguma vez observadas em caucásios.

O metabolismo da INH não sofre interferências de outros fármacos com capacidade indutora/inibidora enzimática, nomeadamente da rifampicina, nem com os retrovirais usados nos doentes com SIDA (Conte *et al.*, 2002).

As restantes enzimas que atuam na via de degradação da INH, não parecem ser relevantes para as suas concentrações plasmáticas.

As baixas concentrações plasmáticas de INH nos AR são uma das razões para o insucesso terapêutico, para a recaída e emergência de resistência. Por outro lado, e como já foi referido, as concentrações plasmáticas de INH nos AL, após a administração de

uma dose *standard*, podem ser tóxicas. Por estas razões, um ajustamento da dose, quer em AL, quer em AR, pode ser útil para assegurar o sucesso da terapia.

1.4. Hepatotoxicidade induzida pela INH

Os principais efeitos secundários do tratamento da INH são a neuropatia periférica (Enans, 1989, Martinjak-Dvorsek *et al.*, 2000), febre (Lee, CH *et al.*, 1996), toxicidade cutânea, artrítica e gastrointestinal (Schaberg *et al.*, 1996) e a HT (Enans, 1989; Durant *et al.*, 1996), o mais temível.

A incidência da HT induzida pela INH varia entre 1 e 36%, dependendo dos diferentes protocolos terapêuticos e definições de lesão hepática usados (Huang *et al.*, 2003). A incidência varia com a origem étnica da população, sendo mais frequente nos asiáticos, o que em parte se deve às variações genéticas entre as populações (Tostmann, *et al.*, 2008). Há outros fármacos usados na terapêutica da TB que também são hepatotóxicos como a RIF e a PZA, mas a toxicidade à INH assume as formas mais graves, evoluindo por vezes para hepatites fulminantes que exigem transplante hepático ou que são fatais. Nos CHUC, nos últimos 6 anos foi necessário recorrer a 4 transplantes. O risco ocorre igualmente para os indivíduos que fazem IHN profilática após contacto com um infetado.

A definição de HT mais comum é o aumento do nível sérico das transaminases (glutâmico pirúvica ou TGP, e oxalacética ou TGO) para valores superiores a 3 vezes o limite superior do normal associado a sintomatologia, ou 5 vezes o limite superior do normal sem sintomas. O aumento assintomático das transaminases é frequente durante o

tratamento da tuberculose, o que pode ser fatal uma vez que a HT não é precocemente reconhecida e o tratamento não é interrompido a tempo (Tostmann *et al.*, 2008).

Frequentemente a HT resulta da alteração do metabolismo normal dos fármacos com desvio para vias alternativas que conduzem à síntese de intermediários tóxicos. A nível do hepatócito ocorrem esteatose e necrose, como consequência da ligação covalente dos metabolitos tóxicos a macromoléculas celulares, vacuolização e aumento do volume das mitocôndrias (Jaeschke *et al.*, 2002). A colestase, em maior ou menor grau, está sempre presente e contribui para a lesão do hepatócito.

No caso do metabolismo da INH, a diminuição da atividade da NAT2 poderá ser um dos principais fatores de risco de HT uma vez que o fármaco passa a ser acetilado mais lentamente, ficando sujeito a maior hidrólise direta. Esta reação produz hidrazina, um metabolito tóxico que pode induzir lesão hepática (Scales & Timbrell, 1982), como já foi anteriormente referido. A quantidade deste composto tóxico é consideravelmente maior nos AL (Blum *et al.*, 1990; Grant *et al.*, 1991), não só porque acetilam mais lentamente a INH como também a acetil-hidrazina (Lauterburg *et al.*, 1985) (figura 5).

Kinzig-Schippers *et al.* (2005), num estudo na população alemã, estimaram que a incidência de reações adversas à INH após um tratamento *standard* foi mais elevada em AL (83.3%), do que nos AR (0%) e AI (2.4%). Estes autores demonstraram que existe uma boa correlação entre o baixo valor da razão entre os níveis séricos de N-acetil-isoniazida e INH e a ocorrência de reações adversas de HT.

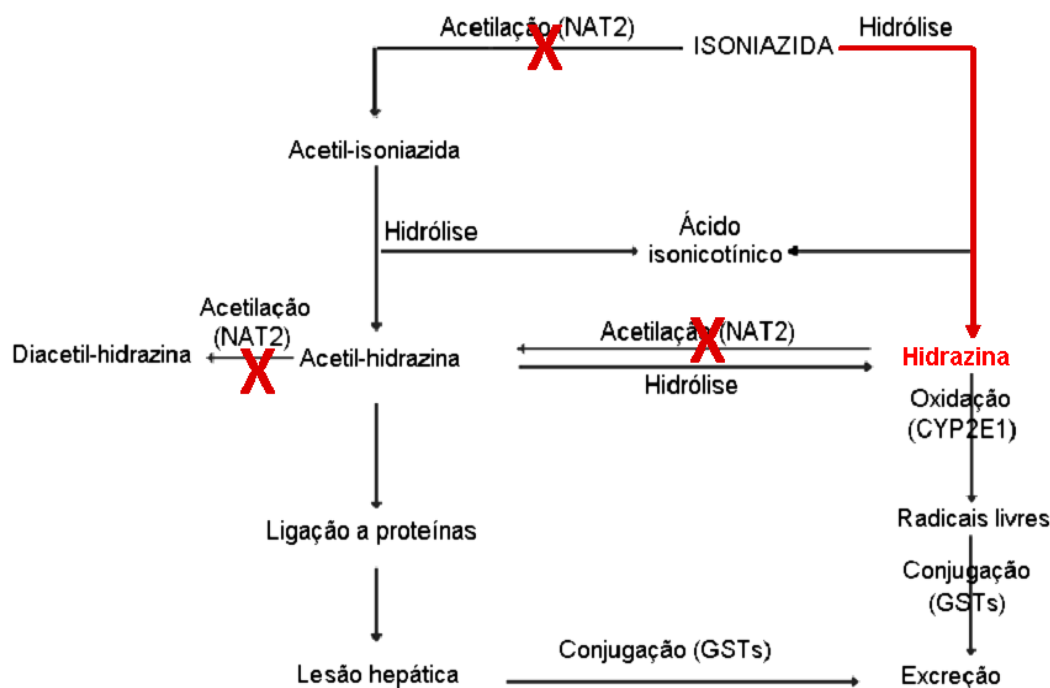


Figura 5 - Correlação entre o défice funcional da enzima NAT2 e risco de HT. Os elevados níveis séricos de INH, por baixa capacidade de acetilação da NAT2, promovem o desvio do metabolismo da INH no sentido da sua hidrólise e consequente produção de metabolitos tóxicos (Adaptado de Yue et al, 2009).

Contudo, a ocorrência de HT induzida pela INH não depende apenas dos níveis séricos de INH ou de hidrazina, essencialmente dependentes da atividade da NAT2 hepática. Outras enzimas como a CYP2E1, as GSTs e proteínas intervenientes noutras funções hepáticas, como o transporte de sais biliares, podem contribuir. De facto, o fenótipo HT, revela-se complexo, dependente não só de múltiplas variantes genéticas como também de fatores do meio.

Do ponto de vista genético, as variações inter-individuais no fenótipo de acetilação e a suscetibilidade à toxicidade da INH são determinadas pela existência de polimorfismos dos genes que codificam as diferentes proteínas hepatocitárias.

1.4.1. A enzima NAT2 e o gene NAT2

Os polimorfismos podem ser definidos como variações da sequência de DNA, não diretamente associadas a patologia, que geralmente ocorrem com uma frequência superior a 1% na população (Ingelman-Sundberg, 2001; Giacomini, *et al.*, 2007). Estes polimorfismos genéticos, se funcionais, causam a anulação, redução, ou aumento da atividade da enzima. As variantes genéticas podem incluir deleções ou duplicação de genes, variantes conhecidas como “*Coppy number variation*” (CNVs, variações do nº de cópias) ou polimorfismos de nucleótido único (SNP’s, de *Single Nucleotide Polymorphisms*) que ocorrem isoladamente ou em sinergia.

O gene NAT2, que codifica a N-acetiltransferase 2, situa-se no braço curto do cromossoma 8, na posição 21.3 (Hickman *et al.*, 1994). Alguns polimorfismos funcionais do gene NAT2 são responsáveis pela variação interindividual na atividade enzimática da NAT2: desta forma, os portadores de um ou dois alelos correspondentes a elevada atividade enzimática são designados por AI e AR, respetivamente, e os portadores de dois alelos correspondentes a baixa atividade enzimática são designados por AL. A elevada correlação entre o genótipo e o fenótipo de acetilação, permite que a determinação do perfil genotípico do doente possa desempenhar um papel fundamental na determinação dos níveis séricos e eficácia da INH e eventualmente contribuir para a

avaliação do risco de efeitos secundários (Walraven *et al.*, 2008; Kinzig-Schippers, 2005).

Atualmente, estão descritos vários polimorfismos de tipo SNP no gene *NAT2* que no conjunto permitem identificar 62 combinações de alelos ou haplótipos (tabela I). A nomenclatura dos polimorfismos do gene *NAT2* pode ser encontrada no *website* oficial: <http://louisville.edu/medschool/pharmacologyconsensus-human-arylamine-n-acetyltransferase-gene-nomenclature/>.

Dos SNP's que identificam os alelos correspondentes a baixa atividade enzimática, os que se encontram nas posições 191, 341, 590 e 857, são do tipo *missense* (levam à substituição de um aminoácido por outro) e caracterizam os grupos de alelos variantes associados com o fenótipo lento mais frequentes entre caucasianos, *NAT2*14*, *NAT2*5*, *NAT2*6* e *NAT2*7* respetivamente (Hein, 2009).

Os mecanismos de interferência das variantes genéticas com a função enzimática são diversos e por vezes mal caracterizados.

Os alelos *14A e *6B são responsáveis pela redução na atividade catalítica da N- e da O-acetiltransferase, associada à diminuição da estabilidade da proteína (Zhu *et al.*, 2002). O alelo *5D, o mais comum na população caucasiana (Grant *et al.*, 1997), parece codificar uma proteína que forma agregados e é sinalizada para degradação sem que a sua estabilidade seja alterada (Zang *et al.*, 2004; Walraven *et al.*, 2008). O alelo *7A, comum na população asiática (Grant *et al.*, 1997) é responsável por reduções nas atividades catalíticas da N- e da O-acetiltransferase para alguns substratos mas não para outros, por interferência na estabilidade térmica da proteína (Zang, *et al.*, 2007). Huang *et al.* (2002) classificaram a atividade de acetilação *in vitro* das várias isoformas da *NAT2* da seguinte forma: *NAT2*4*>**7*>**6*>**5*.

Os alelos *11, *12 e *13 não se associam a alteração dos níveis de expressão da proteína nem da sua estabilidade ou atividade catalítica (Hein *et al.*, 1994; Zang, *et al.*, 2007). Estudos funcionais do alelo *18 em leveduras, mostraram uma termo-estabilidade reduzida a 50°C, mas nenhuma alteração na atividade catalítica ou na expressão da enzima (Fretland *et al.*, 2001). Desta forma, estes alelos (com a exceção do *12D) codificam isoformas de elevada atividade, associadas com o fenótipo AR.

O alelo *NAT2**4 é considerado o *wild-type* ou alelo de referência, e codifica uma enzima de elevada atividade.

Tabela I - Alelos do gene *NAT2*

Alelo <i>NAT2</i> (Haplótipo)	Polimorfismos	Alteração(ões) do(s) Aminoácido(s)	Fenótipo
<i>NAT2</i>*4	Referência	Referência	Rápido
<i>NAT2</i> *5 ^a	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929)	I114T L161L (sinónimo)	Lento
<i>NAT2</i> *5B	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208)	I114T L161L (sinónimo) K268R	Lento
<i>NAT2</i> *5C	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>A803G</i> (rs1208)	I114T K268R	Lento
<i>NAT2</i> *5D	<i>T341C</i> (rs1801280)	I114T	Lento
<i>NAT2</i> *5E	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>G590A</i> (rs1799930)	I114T R197Q	Lento
<i>NAT2</i> *5F	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>C759T</i> <i>A803G</i> (rs1208)	I114T L161L (sinónimo) K268R V253V (sinónimo)	Lento
<i>NAT2</i> *5G	<i>C282T</i> (rs1041983) <i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208)	Y94Y (sinónimo) I114T L161L (sinónimo) K268R	Lento
<i>NAT2</i> *5H	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208) 859Del	I114T L161L (sinónimo) K268R S287 Frameshift	Lento
<i>NAT2</i> *5I	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>A411T</i> (rs4986997) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208)	I114T L137F L161L (sinónimo) K268R	Lento
<i>NAT2</i> *5J	<i>C282T</i> (rs1041983) <i>T341C</i> (rs1801280)	Y94Y (sinónimo) I114T	Lento

Alelo NAT2 (Haplótipo)	Polimorfismos	Alteração(ões) do(s) Aminoácido(s)	Fenótipo
	G590A (rs1799930)	R197Q	
NAT2*5K	C282T (rs1041983) T341C (rs1801280)	Y94Y (sinónimo)	
NAT2*5L	T70A T341C (rs1801280) C481T (rs1799929) A803G (rs1208)	L24I I114T L161L (sinónimo) K268R	
NAT2*5M	T341C (rs1801280) C481T (rs1799929) A803G (rs1208) G838A	I114T L161L (sinónimo) K268R V289M	
NAT2*6^a	C282T (rs1041983) G590A (rs1799930)	Y94Y (sinónimo) R197Q	Lento
NAT2*6B	G590A (rs1799930)	R197Q	Lento
NAT2*6C	C282T (rs1041983) G590A (rs1799930) A803G (rs1208)	Y94Y (sinónimo) R197Q K268R	Lento
NAT2*6D	T111C C282T (rs1041983) G590A (rs1799930)	F37F (sinónimo) Y94Y (sinónimo) R197Q	Lento
NAT2*6E	C481T (rs1799929) G590A (rs1799930)	L161L (sinónimo) R197Q	Lento
NAT2*6F	G590A (rs1799930) A803G (rs1208)	R197Q K268R	
NAT2*6G	C282T (rs1041983) A518G G590A (rs1799930)	Y94Y (sinónimo) K173R R197Q	
NAT2*6H	C282T (rs1041983) G590A (rs1799930) A766G	Y94Y (sinónimo) R197Q K256E	
NAT2*6I	C282T (rs1041983) G590A (rs1799930) G838A G857A	Y94Y (sinónimo) R197Q V280M G286E	
NAT2*6J	C282T (rs1041983) G590A (rs1799930) G857A (rs1799931)	Y94Y (sinónimo) R197Q G286E	
NAT2*6K	C282T (rs1041983) G590A (rs1799930) C638T	Y94Y (sinónimo) R197Q P213L	
NAT2*6L	C282T (rs1041983) C345T G590A (rs1799930)	Y94Y (sinónimo) D115D (sinónimo) R197Q	
NAT2*7A	G857A (rs1799931)	G286E	Lento; Dependente de substrato?
NAT2*7B	C282T (rs1041983) G857A (rs1799931)	Y94Y (sinónimo) G286E	Lento; Dependente de substrato?
NAT2*10	G499A	E167K	Lento; Dependente de substrato?
NAT2*11A	C481T (rs1799929)	L161L (sinónimo)	Rápido
NAT2*11B	C481T (rs1799929) 8 59Del	L161L (sinónimo) S287 Frameshift	Desconhecido
NAT2*12A	A803G (rs1208)	K268R	Rápido
NAT2*12B	C282T (rs1041983)	Y94Y (sinónimo)	Rápido

Alelo NAT2 (Haplótipo)	Polimorfismos	Alteração(ões) do(s) Aminoácido(s)	Fenótipo
	<i>A803G (rs1208)</i>	K268R	
<i>NAT2*12C</i>	C481T (rs1799929) <i>A803G (rs1208)</i>	L161L (sinónimo) K268R	Rápido
<i>NAT2*12D</i>	G364A (rs4986996) <i>A803G (rs1208)</i>	D122N K268R	Lento
<i>NAT2*12E</i>	C282T (rs1041983) C578T <i>A803G (rs1208)</i>	Y94Y (sinónimo) T193M K268R	
<i>NAT2*12F</i>	T622C <i>A803G (rs1208)</i>	Y208H K268R	
<i>NAT2*12G</i>	G609T <i>A803G (rs1208)</i>	E203D K268R	
<i>NAT2*12H</i>	C403G <i>A803G (rs1208)</i>	L135V K268R	
<i>NAT2*13^a</i>	<i>C282T (rs1041983)</i>	Y94Y (sinónimo)	Rápido
<i>NAT2*13B</i>	<i>C282T (rs1041983)</i> C578T	Y94Y (sinónimo) T193M	
<i>NAT2*14A</i>	<i>G191A (rs1801279)</i>	R64Q	Lento
<i>NAT2*14B</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> C282T (rs1041983)	R64Q Y94Y (sinónimo)	Lento
<i>NAT2*14C</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> T341C (rs1801280) C481T (rs1799929) <i>A803G (rs1208)</i>	R64Q I114T L161L (sinónimo) K268R	Lento
<i>NAT2*14D</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> C282T (rs1041983) G590A (rs1799930)	R64Q Y94Y (sinónimo) R197Q	Lento
<i>NAT2*14E</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> <i>A803G (rs1208)</i>	R64Q K268R	Lento
<i>NAT2*14F</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> T341C (rs1801280) <i>A803G (rs1208)</i>	R64Q I114T K268R	Lento
<i>NAT2*14G</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> C282T (rs1041983) <i>A803G (rs1208)</i>	R64Q Y94Y (sinónimo) K268R	Lento
<i>NAT2*14H</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> C282T (rs1041983) C683T	R64Q Y94Y (sinónimo) P228L	
<i>NAT2*14I</i>	<i>G191A (rs1801279)</i> C481T (rs1799929) <i>A803G (rs1208)</i>	R64Q L161L (sinónimo) K268R	
<i>NAT2*17</i>	<i>A434C</i>	Q145P	Lento
<i>NAT2*18</i>	<i>A845C</i>	K282T	Rápido
<i>NAT2*19</i>	<i>C190T (rs1805158)</i>	R64W	Lento

(adaptado de Walraven et al., 2008)

Polimorfismos no gene *NAT2* que confirmam o fenótipo AL são considerados fatores de risco para a ocorrência de HT induzida pela INH. A associação entre

genótipos do *NAT2* correspondentes a AL e suscetibilidade para HT induzida pela INH foi verificada em diferentes populações (Tabela II). No entanto, nem todos os autores confirmam esta correlação (Yamada et al., 2009).

Tabela II - Exemplos de estudos em que se correlaciona o fenótipo de acetilação, obtido a partir de genotipagem do *NAT2*, com a ocorrência de hepatotoxicidade.

Ref.	População	Com HT		Sem HT		OR (95% CI)	P
		Fenótipo	%	Fenótipo	%		
Leiro-Fernandez et al., 2011	Espanha N=1200	AR	10	AR	9,4		0.84
		AI	18.8	AI	22,2		0.34
		AL	72	AL	68,4		0.46
Ohno et al., 2000	Japão N = 77	AR	3.5	AR	96.5	1 (referência) 4.0 (1.94-6.06) 28.0 (26-30)	
		AI	14.3	AI	85.7		
		AL	100	AL	0		
Cho et al., 2007	Coreia N = 132	AR/AI	9.7	AR/AI	90.3	0.18 (0.06-0.57) 5.41 (1.76-16.59)	
		AL	36.8	AL	63.2		
Lee et al., 2010	Taiwan N = 140	AR	24.2	AR	75.8	1 (referência) 3.28 (1.53-7.06)	
		AL	51.2	AL	48.8		
Teixeira et al., 2011	Brasil N= 167	AR	0	AR	5	1 (referência) 2.86 (1.06-7.68)	
		AL	69,2	AL	45,4		

HT: hepatotoxicidade; OR: odds ratios; IC: intervalos de confiança

A frequência dos polimorfismos do *NAT2* e correspondentes fenótipos diferem entre grupos étnicos: assim a maioria dos caucasianos, mas apenas 10% dos Japoneses, 13% dos Indianos e 29% dos Chineses são AL. Estas diferenças têm repercussões nas diferentes taxas de reações adversas a fármacos, de acordo com a ascendência dos doentes (Goldenkova-Pavlova et al., 2006).

1.4.2. A enzima CYP2E1 e o gene *CYP2E1*

As enzimas do citocromo P450 são as mais importantes da fase I do metabolismo. Múltiplas formas destas enzimas desempenham importantes funções na oxidação de diversos fármacos (Andrade *et al.*, 2009).

Do citocromo P450 destaca-se a citocromo P450 2E1 (CYP2E1), codificada pelo gene *CYP2E1* e expressa não só no fígado como em outros órgãos como rins, pulmões, cérebro, mucosa nasal e linfócitos (Lieber, 1997). Devido ao grande número de substratos (Tanaka *et al.*, 2000) e ao facto de ser uma das proteínas CYP mais abundantes (Neafsey *et al.*, 2009), a CYP2E1 desempenha um importante papel na área da toxicologia clínica. É uma enzima-chave na oxidação hepática e está envolvida na ativação metabólica de compostos lipofílicos de baixo peso molecular como a acetona (Carrière *et al.*, 1996) e de fármacos como o acetaminofeno, o enflurano, a INH, o pirazol, a 7-etoxicoumarina, ou a clorzoxazona (Neafsey *et al.*, 2009), e de muitos carcinogénios (Lucas *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2003). No caso da INH, a CYP2E1 catalisa a ativação deste fármaco para um metabolito hepatotóxico (Ryan *et al.*, 1985).

Dada a importância da CYP2E1 na ativação xenobiótica, o grau de variabilidade nos níveis de enzima é uma fonte potencial de diferenças inter-individuais na suscetibilidade aos tóxicos. No entanto, é importante considerar vários outros fatores como sejam a indução e inibição dos níveis de expressão da enzima. O álcool (Takahashi *et al.*, 1993), a obesidade (Salazar *et al.*, 1988; Raucy *et al.*, 1991; O'Shea *et al.* 1994), o fumo do tabaco (Benowitz *et al.*, 1999) e a própria hidrazina, produto do metabolismo da INH (Jenner & Timbrell, 1995, 1994a, 1994b) são conhecidos indutores da CYP2E1. Como inibidores desta enzima existe o dissulfiram (Brady *et al.*, 1991) e o dietilditiocarbamato (Stot *et al.*, 1997). A idade também constitui um fator

importante na atividade da CYP2E1. George *et al.* (1995) verificaram uma associação negativa entre a idade e o conteúdo total da CYP2E1 em amostras de uma biópsia ao fígado e Tanaka (1998) concluiu que a atividade do CYP2E1 aumenta rapidamente após o nascimento, atingindo um *steady-state* até à fase adulta, seguindo-se uma diminuição gradual até aos 64 anos, quando os níveis de enzima decaem rapidamente.

O gene *CYP2E1* situa-se no cromossoma 10 e apresenta 9 exões. Os polimorfismos que modulam a sua atividade localizam-se principalmente em regiões reguladoras.

Até ao presente, foram descritas 13 variantes alélicas deste gene (tabela III). A nomenclatura dos polimorfismos do gene *CYP2E1* pode ser encontrada no *website* oficial: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>.

Tabela III - Alelos do gene *CYP2E1*

Alelo	Alterações nucleotídicas	RFLP	Alteração no aminoácido
<i>CYP2E1</i> *1A			
<i>CYP2E1</i> *1B	9896C>G	Taq ⁺	
<i>CYP2E1</i> *1C	6 repeats na região 5'		
<i>CYP2E1</i> *1D	8 repeats na região 5'	<i>Dra</i> I e <i>Xba</i> I	
<i>CYP2E1</i> *2	1132G>A		R76H
<i>CYP2E1</i> *3	10023G>A		V389I
<i>CYP2E1</i> *4	4768G>A		V179I
<i>CYP2E1</i> *5A	-1293G>C; -1053C>T (c1>c2); 7632T>A	<i>Pst</i> I ⁺ <i>Rsa</i> I <i>Dra</i> I	
<i>CYP2E1</i> *5B	-1293G>C; -1053C>T (c1>c2)	<i>Rsa</i> I ⁻ <i>Pst</i> I ⁺	
<i>CYP2E1</i> *6	7632T>A	<i>Dra</i> I	
<i>CYP2E1</i> *7A	-333T>A		
<i>CYP2E1</i> *7B	-71G>T; -333T>A		
<i>CYP2E1</i> *7C	-333T>A; -352A>G		

Muitos dos polimorfismos estudados associam-se a variações em sequências de restrição de endonucleases, pelas quais são habitualmente referenciados, como a *RsaI*, *TaqI*, *DraI* e *PstI*; contudo, o seu significado funcional permanece controverso, uma vez que ainda não existe uma correlação evidente com diferenças na atividade catalítica da enzima (Vuilleumier *et al.*, 2006). A maioria destes polimorfismos localiza-se em regiões não codificantes e pensa-se que possam alterar os níveis de expressão génica e tenham implicações nos níveis de enzima *in vivo*.

Os alelos *5A, *5B (na região reguladora) e o *6 (no intrão 6) são os com maior evidência de associação a alterações nos níveis de expressão da enzima (Neafsey *et al.*, 2009). Os alelos *5A e *5B apresentam a transição 1053 C>T, que é detetada pela ausência de restrição pela *RsaI* (sendo por isso designado de *RsaI*- ou alelo c2), e a transversão 1293 G>C, uma variante reconhecida pela restrição pela *PstI* (ambos os SNPs estão em desequilíbrio de ligação). O alelo *5A tem uma substituição nucleotídica adicional, a 7632 T>A, detetada pela ausência de restrição pela *DraI* no intrão 6, sendo por isso designado por *RsaI*-/*DraI*- (c2/C) (Neafsey *et al.*, 2009). O alelo *6 apenas apresenta a substituição nucleotídica identificada pela *DraI*, designa-se por c1/C, constitui o polimorfismo mais comum em caucasianos e afro-americanos (Neafsey *et al.*, 2009) e parece associar-se a diminuição *in vivo* da atividade da enzima (Kim *et al.*, 1995). Na tabela IV resume-se a nomenclatura dos alelos para as variantes -1053 C>T e 7632 T>A.

Tabela IV – Correspondência entre as diversas nomenclaturas para os alelos do gene *CYP2E1*.

Alelos	-1053C>T (<i>RsaI</i>)	7632T>A (<i>DraI</i>)
*1A	c1 (<i>Rsa</i> +)	D (<i>Dra</i> +)
*5A	c2 (<i>Rsa</i> -)	C (<i>Dra</i> -)
*5B	c2 (<i>Rsa</i> +)	D (<i>Dra</i> +)
*6	c1 (<i>Rsa</i> -)	C (<i>Dra</i> -)

Rsa+: restrição pela *RsaI*; *Rsa* - : perda do local de restrição para *RsaI*; *Dra* +: restrição pela *DraI*; *Dra* -: perda do local de restrição pela *DraI*;

Os polimorfismos da região 5' do *CYP2E1* impedem a ligação do fator de transcrição *Hepatocyte Nuclear Factor* (*HNF- α*), afetando a transcrição do gene (Watanabe *et al.*, 1994). Desta forma, o alelo c2 é responsável por uma menor atividade da *CYP2E1*, comparativamente com o *wild-type* (c1/c1) (Huang *et al.*, 2003). Hayashi *et al.* (1991), Watanabe *et al.* (1990), Maezawa *et al.* (1994), Chao *et al.* (1995) e Huang *et al.* (2003) verificaram a existência de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *RsaI*- e *PstI*. Desta forma, o alelo c1 caracteriza-se por ter um local de restrição pela *RsaI* e pela ausência do local de restrição pela *PstI*, e o alelo c2 pela ausência de restrição pela *RsaI* e pela restrição pela *PstI*.

Por sua vez, a variante 7632T>A, sendo uma substituição nucleotídica numa zona intrónica, é pouco provável que afete diretamente a expressão do gene. Contudo, Uematsu *et al* (1994) sugerem que poderá ser um marcador em desequilíbrio de ligação com uma outra variante, ainda desconhecida, essa sim com significado funcional.

O alelo *wild-type* do gene *CYP2E1*, designado por c1/D ou por *1A, é o predominante em caucasianos e afro-americanos (Neafsey *et al.*, 2009). Cerca de 90-92% dos caucasianos são homozigóticos para este alelo (Persson *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 1994). A frequência do genótipo homozigótico para o polimorfismo *RsaI* (-) é

cerca de 1% e do genótipo heterozigótico é de 7 a 9% (Persson *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 1994). O polimorfismo *DraI*(-) tem uma frequência de 8 a 11% em caucasianos (Persson *et al.*, 1993; Hirvonen *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 1994; Matthias *et al.*, 1998).

Vários estudos demonstraram que a CYP2E1 está envolvida na HT medicamentosa (Huang *et al.*, 2003; Vuilleumier *et al.*, 2006) e na lesão hepática (Sun *et al.*, 2008). O genótipo c1/c1 (*wild-type*) é o genótipo está associado a uma maior suscetibilidade a ocorrência de HT (tabela IV), uma vez que está associado a uma maior atividade da enzima e, por conseguinte, a uma maior produção de hepatotoxinas. Verifica-se, ainda, uma tendência para o aumento da HT quando há em simultâneo o genótipo c1/c1 e genótipo correspondente a AL, com um efeito independente mas aditivo destes dois fatores genéticos na HT (Huang *et al.*, 2003).

Estudos feitos em ratinhos *knock-out* para o gene *CYP2E1* mostraram que quando estes eram expostos ao acetaminofeno, eram 2 vezes menos sensíveis aos efeitos tóxicos do fármaco, comparativamente com os ratinhos *wild-type* (Lee *et al.*, 1996) confirmando o envolvimento do CYP2E1 na HT do acetaminofeno.

Tabela V - Tabela de referências que correlacionam os genótipos *CYP2E1* com a presença de hepatotoxicidade.

Ref.	População	Com HT		Sem HT		OR (95% CI)	P
		Genótipo	%	Genótipo	%		
Huang <i>et al.</i> , 2003	Taiwan N=318	c1/c1	20,0	c1/c1	80,0	0.60 (0.12-3.05) 1.63 (0.35-7.52) 1 (referência)	-
		c1/c2	8,55	c2/c2	86,7		
		c2/c2	13,3	c1/c2	91,5		
Teixeira <i>et al.</i> , 2011	Brasil N=167	c1/c1	88,5	c1/c1	90,8	-	0.06
		c1/c2	7,7	c1/c2	9,2		
		c2/c2	3,8	c2/c2	0		

HT: hepatotoxicidade; OR: odds ratios; IC: intervalos de confiança

1.4.3. A enzima GST e os genes *GSTT1* e *GSTM1*

As Glutationas S-Transferases (GST) são enzimas da fase II do metabolismo e estão divididas em oito classes: α (alfa), κ (kappa), μ (um), ω (ómega), π (pi), σ (sigma), θ (theta) e ζ (zeta). São conhecidas por desempenharem funções importantes na proteção contra o stresse oxidativo e na destoxificação de potenciais toxinas endógenas, incluindo carcinogénios e fármacos (Strange *et al.*, 2001). Estas propriedades devem-se ao facto de estas enzimas catalisarem a conjugação da glutathiona (GSH) com vários substratos endógenos e exógenos (figura 6), originando compostos inativados e hidrossolúveis que podem ser excretados pela urina ou pela bÍlis. Desta forma, estas enzimas protegem as células da reatividade dos tóxicos com as macromoléculas celulares (Boyer, 1989).

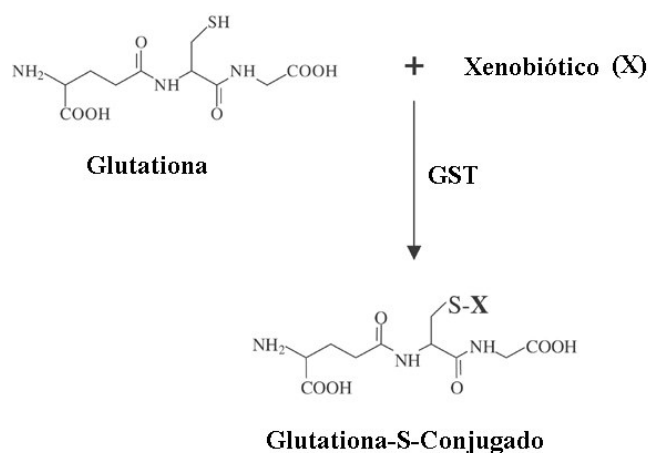


Figura 6 - Conjugação da glutathiona a um xenobiótico por ação da GST, resultando na formação da glutathiona-s-conjugado (adaptado de Townsend & Tew, 2003).

Duas das isoenzimas mais relevantes são a *GSTT1* (glutationa-s-transferase da classe θ) e *GSTM1* (glutationa-s-transferase da classe μ), codificadas pelos genes

GSTT1 (localizado no braço longo do cromossoma 22 na posição 11.2) e *GSTM1* (localizado no braço curto do cromossoma 1, na posição 13.3), respetivamente.

Não obstante a sua importância para a destoxificação de tóxicos endógenos e exógenos, estas enzimas estão ausentes numa elevada percentagem da população humana (Bolt & Thier, 2006; Garte *et al.*, 2001), por deleção, em homozigotia, dos genes correspondentes. Embora estas deleções sejam polimorfismos, os portadores são mais suscetíveis aos efeitos de vários xenobióticos, incluindo a maior ocorrência de HT. Estão descritos alguns SNP's nos genes *GSTT1* e *GSTM1*, mas são raros e o seu significado funcional tem sido pouco explorado (Moyer *et al.*, 2007).

O gene *GSTT1* tem 5 exões e é polimórfico nos seres humanos, tendo dois alelos principais: *GSTT1**A e *GSTT1**0 ou alelo nulo, resultante da deleção. O gene que codifica a *GSTM1* é constituído por 7 exões e tem como variantes os alelos: *GSTM1**A, *B, *C e *0 ou nulo, resultante da deleção (Strange *et al.*, 2001).

A frequência dos alelos *GSTT1**0 e *GSTM1**0 e a combinação de ambas as deleções na população caucasiana e asiática foi obtida de acordo com a base de dados do *International Project on Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens* (GSEC) e encontra-se compilada na tabela VI:

Tabela VI - Frequências alélicas das deleções *GSTT1**0 e *GSTM1**0 em caucasianos e asiáticos.

Alelo	Grupo étnico	Frequência de homozigóticos
<i>GSTT1</i> *0	Caucasianos	13 a 26%
	Asiáticos	35 a 52%
<i>GSTM1</i> *0	Caucasianos	42 a 60%
	Asiáticos	42 a 54%
Combinação <i>GSTM1</i> *0/ <i>GSTT1</i> *0	Caucasianos	10.4%
	Asiáticos	24,6%

Adaptado de Garte *et al.*, 2001

O gene *GSTM1* é flanqueado por duas regiões de 4.2 Kb de elevada homologia (figura 7a). A deleção *GSTM1*0* é causada por uma recombinação homóloga que envolve essas regiões repetitivas (Xu *et al.*, 1998). Da mesma forma, o gene *GSTT1* situa-se no meio de duas regiões de 18 kb (HA3 e HA5) que apresentam uma homologia superior a 90% (Fig. 7b). Existe uma sequência de 403 pb em cada uma destas regiões homólogas, com uma identidade de 100% (Parl, 2005). A recombinação homóloga dessas sequências repetitivas de 403 pb (Fig. 7b, em baixo) resulta numa deleção de 54 kb que abrange todo o gene *GSTT1* (Sprenger *et al.*, 2000).

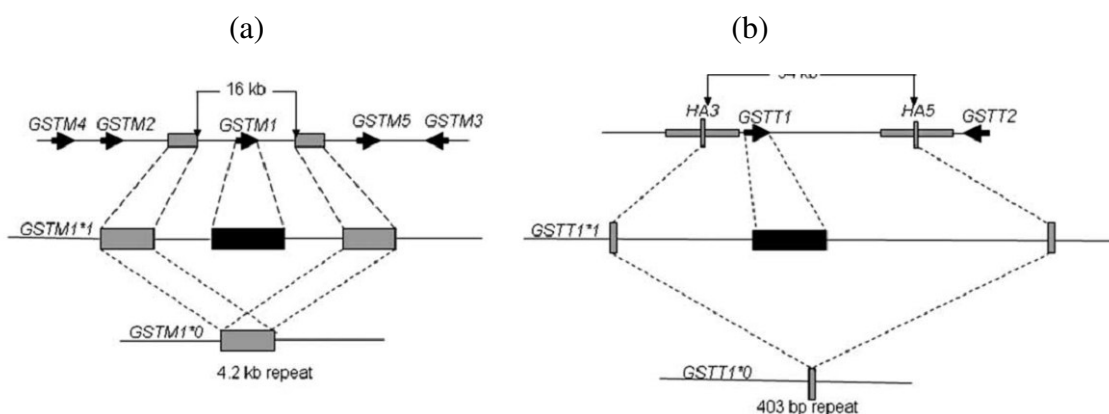


Figura 7 - Estrutura dos loci dos genes *GSTM* (a) e *GSTT* (b). A recombinação homóloga das regiões repetitivas que flanqueiam *GSTM1* e *GSTT1* causam deleções que abrangem a totalidade destes genes (adaptado de Parl, 2005).

As deleções em homozigotia de genes que codificam GSTs são, também, fatores de risco para a HT. O sistema enzimático que envolve a conjugação da glutationa através da GST tem um importante papel na destoxificação de espécies reativas de oxigénio (Sies, 1991). Os níveis reduzidos de glutationa e a redução na atividade da GST, da GS catalase e da GS superóxido dismutase, depois da administração da INH ou

hidrazina em ratos, indicam que o stress oxidativo está envolvido na HT induzida pela INH (Sodhi *et al.*, 1996; Sodhi *et al.*, 1997).

Um estudo em Caucasianos (Leiro *et al.*, 2008) mostrou uma associação significativa entre a homozigotia para a deleção do *GSTT1* e a HT induzida por fármacos anti-TB, mas não entre a homozigotia para a deleção do *GSTM1* e a ocorrência daquele efeito adverso. No entanto, um estudo de meta-análise (Sun *et al.*, 2008) mostrou que o genótipo nulo para o gene *GSTM1* estava associado a uma suscetibilidade genética a lesão hepática induzida por fármacos anti-TB, não revelando uma associação significativa entre a deleção do gene *GSTT1* e a ocorrência de lesão.

A associação entre as deleções em homozigotia dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a suscetibilidade para HT induzida pela INH em diferentes populações encontra-se descrita nas tabelas VII e VIII:

Tabela VII - Referências que correlacionam a deleção do *GSTT1* com a presença de HT.

Ref.	População	Com HT		Sem HT		OR (95% CI)	P
		Genótipo	(%)	Genótipo	(%)		
Lucena <i>et al.</i> , 2008	Espanha N=154	*O/O	(18.2)	*O/O	(7.6)	2.70 (1.45–5.03)	0.002
		*A/A	(33.1)	*A/A	(38.8)	0.78 (0.51–1.19)	0.365
		*A/O	(48.7)	*A/O	(53.6)	0.82 (1.02–0.63)	0.272
Teixeira <i>et al.</i> , 2011	Brasil N=167	*O/O	(15,4)	*O/O	(19,2)	-	0.666
		*A/A	(34.6)	*A/A	(26.2)		
		*A/O	(50)	*A/O	(54.6)		

HT: hepatotoxicidade; OR: odds ratios; IC: intervalos de confiança

Tabela VIII - Referências que correlacionam a deleção do *GSTM1* com a presença de HT.

Ref.	População	Com HT		Sem HT		OR (95% CI)	P
		Genótipo	(%)	Genótipo	(%)		
Leiro <i>et al.</i> , 2008	Espanha N= 95	*O/*O	34,3%	*O/*O:	41,7%	0.73 (0.31–1.73)	0.47
Teixeira <i>et al.</i> , 2011	Brasil N=167	*O/*O	42,3%	*O/*O	43,3%	-	0.93
		*A/*A e		*A/*A +			
		*A/*O	41.7%	*A/*O:	56.7%		

HT: hepatotoxicidade; OR: odds ratios; IC: intervalos de confiança

1.4.4. Gene ABCB11

O déficit do transporte hepático dos constituintes biliares tem sido descrito como estando associado a reações de HT com componente colestático.

Strautnieks *et al* (1998) verificaram a ocorrência de HT induzida pelos sais biliares em crianças que apresentavam uma mutação na bomba de efluxo de sais biliares (BESB) da membrana canalicular do hepatócito. A acumulação de sais biliares resulta na externalização do recetor Fas na membrana plasmática e na sua auto-agregação, o que vai levar à ativação de caspases e, conseqüentemente, à apoptose (Miyoshi *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 1998) (fig.8).

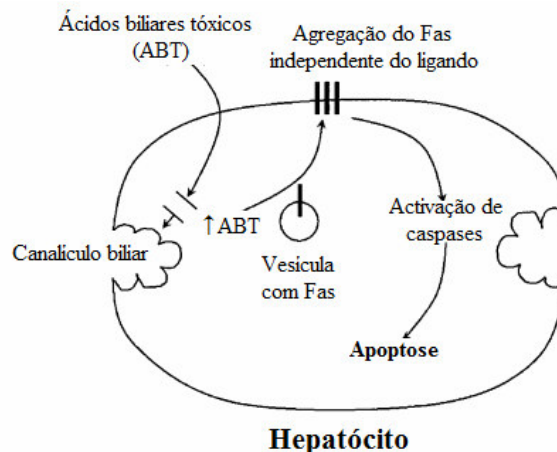


Figura 8 - Apoptose do hepatócitos induzida por ácidos bilares. Os ácidos biliares são secretados pelos hepatócitos através de transportadores localizados na membrana canalicular. Na colestase, essa secreção está diminuída, o que resulta na acumulação de elevadas concentrações de ABT nos hepatócitos. A concentrações patofisiológicas os ABT desencadeiam a externalização dos recetores Fas, que se auto-agregam na ausência de ligando. A ativação destes recetores na membrana plasmática promove a ativação de caspases e, conseqüentemente, desencadeia a cascata apoptótica (Adaptado de Jaeschke et al, 2002).

Desta forma, fatores genéticos ou ambientais que afetem os sistemas de transporte biliar vão determinar a exposição dos hepatócitos não só a fármacos tóxicos como também a constituintes biliares tóxicos, representando fatores de risco para lesão hepática medicamentosa colestatia.

O gene *ABCB11* situa-se no braço longo do cromossoma 2, na posição 24 e codifica alguns transportadores membranares da superfamília *ATP-binding cassette* (*ABC*), como é o caso da BSEP.

O polimorfismo 1331 T>C, que resulta na substituição de uma valina por uma alanina (V444A; rs2287622) no exão 13 do gene *ABCB11*, foi associado com o aumento do risco de lesão hepática colestatia associada à gravidez (Dixon *et al.*, 2008) e toma de contraceptivos orais (Meier *et al.* 2008). A variante A444 é prevalente em várias populações, ocorrendo com uma frequência de 32,3% em caucasianos, e está associada a níveis reduzidos de BSEP funcional, comparativamente com a variante V444 (Kubitz *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2007; Keitel *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2008). A valina e a alanina têm propriedades químicas semelhantes, mas a valina na posição 444 é altamente conservada em diferentes espécies de mamíferos, podendo ser um pré-requisito importante para o normal funcionamento da BSEP. Desta forma, esta variante poderá ser um fator de risco para desenvolver colestase sob certas condições, como a inibição da função da BSEP por certos fármacos (Meier *et al.*, 2006; Russmann *et al.*, 2009). É de salientar que a inibição específica da BSEP poderá também ser feita diretamente através dos metabolitos reativos resultantes do metabolismo dos fármacos.

Este polimorfismo foi também recentemente descrito como um marcador de prognóstico e de resposta à terapêutica da hepatite pelo vírus VHC (Iwata *et al.*, 2011).

1.4.5. Outros fatores

Existem outros genes que poderão estar envolvidos na HT induzida por fármacos anti-TB. O receptor X do pregnano (PXR) está envolvido na expressão da enzima *CYP3A4* e na forma como os seus indutores (como a rifampicina) podem induzir esta enzima. Polimorfismos genéticos no gene que codifica o PXR desempenham um importante papel na variabilidade da expressão da *CYP3A4* (Hustert *et al.*, 2001) e, desta forma, poderão estar envolvidos na suscetibilidade a HT induzida por fármacos anti-TB. Polimorfismos nos genes que codificam a superóxido dismutase do manganésio também têm sido implicados (Huang *et al.*, 2007).

A lesão hepática induzida por fármacos poderá dever-se não à toxicidade do fármaco ou dos seus metabolitos mas à ocorrência de reações de hipersensibilidade. Estas reações consistem numa resposta imunitária originada a partir da interação de metabolitos tóxicos, resultantes do metabolismo do fármaco, com antigénios específicos do fígado (Warrington & Olivier, 1979). A resposta imunitária determina a extensão da lesão hepática uma vez que o recrutamento de linfócitos e a sua posterior infiltração nas células hepáticas levam à destruição de hepatócitos e colangeócitos e, conseqüentemente, a uma lesão hepática permanente.

Existem outros fatores de risco associados à HT, sendo os mais frequentes o consumo de álcool, a idade avançada, a pré-existência de doença hepática crónica, hepatite B ou C, valores basais anormais das transaminases e a malnutrição (Farrell, 1994; Huang *et al.*, 2002; Fernández-Villar *et al.*, 2004).

O uso concomitante de outros fármacos e toxinas também aumenta a incidência da HT (Zand *et al.*, 1993; Maffei & Carini, 1980; Wong *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2004; Steele *et al.*, 1991) o que pode ser explicado pela existência de possíveis

interações entre fármacos (Sarma *et al.*, 1986; Mitchel *et al.*, 1975). Esta situação está bem patente, por exemplo, na terapêutica combinada de RIF com INH. A RIF induz a hidrolase da INH, aumentando a produção de hidrazina (principalmente nos AL), o que pode explicar a elevada toxicidade da combinação (Blair *et al.*, 1985; Sarma *et al.*, 1986; Steele *et al.*, 1991;).

Dossing *et al.* (1996) e Teleman *et al.* (2002) verificaram que o sexo feminino estava associado a uma maior ocorrência de hepatite medicamentosa. Contudo, este resultado pode apenas sugerir que há um maior acompanhamento dos indivíduos do sexo feminino durante a terapia anti-TB.

A infeção do VIH também aumenta o risco de HT durante o tratamento *standard* da TB (Yee *et al.*, 2003; Small *et al.*, 1991). Doentes com o VIH com doenças agudas têm as vias oxidativas alteradas, o que pode explicar, em parte, o aumento do risco de HT (Lee *et al.*, 1993).

A maior parte das reações adversas, sobretudo a HT medicamentosa, tem várias implicações, entre elas morbilidade e mortalidade (Schaberg *et al.*, 1996). Estes acontecimentos podem levar a custos adicionais substanciais, como consultas ambulatoriais, exames e, nos casos mais graves, hospitalizações. O uso de fármacos alternativos poderá ser visto como uma saída possível, contudo pode trazer problemas ainda maiores e são muitas vezes menos eficazes, levando a que o tratamento seja prolongado. Como resultado, os riscos de insucesso e de recaída são maiores.

Por fim, as reações adversas diminuem o sucesso do tratamento, porque contribuem significativamente para falta de adesão dos doentes ao tratamento, eventualmente contribuindo para uma recidiva ou resistência ao fármaco. Desta forma, torna-se crucial a previsão da ocorrência de HT através da genotipagem dos genes que codificam enzimas metabolizadoras de fármacos envolvidos nessa toxicidade.

1.5. Objetivos

Este estudo teve como principais objetivos:

- Conhecer as frequências dos genótipos de risco dos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *ABCB11* numa população portuguesa de doentes com TB;
- Verificar a associação entre os genótipos/fatores ambientais de risco e a HT induzida pela INH;
- Analisar os possíveis benefícios da individualização da dosagem da INH por genotipagem prévia dos doentes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição da população

Estudaram-se 109 doentes, caucasianos não consanguíneos com diagnóstico de tuberculose pulmonar, sem infeção por VIH, tratados nos CHUC e no SLAT do Centro nos últimos 5 anos. São excluídos deste tipo de estudos doentes com doença alcoólica hepática e hepatites B e C. Todos os doentes foram sujeitos à terapêutica com INH, PZA, RIF e EMB. Os resultados dos testes de função hepática, antes do início do tratamento, mostraram valores de transaminases, AST e ALT, dentro da normalidade.

As características da população de doentes encontram-se descritas na tabela IX:

Tabela IX - Características da população de doentes.

	Homens		Mulheres	
	N (%)	Idade (média; dp)	N (%)	Idade (média; dp)
Geral	77 (70.64)	50 anos; 16.15	32 (29.36)	37 anos; 16.12
Com HT	22 (70.97)	52 anos; 16.32	9 (29.03)	48 anos; 21.91

N- número de indivíduos; dp – desvio padrão; HT – hepatotoxicidade

A todos os doentes foi atribuído um nível de HT (tabela X), tendo-se considerado como ligeira se os valores das enzimas ALT e AST fossem 1.5 vezes o limite superior do normal, ou hepatite tóxica se os valores daquelas enzimas fossem 3 vezes o limite superior do normal.

Tabela X – Classificação do grau de hepatotoxicidade.

Nível	Características	N (%)
0	Sem hepatotoxicidade	78 (71.56)
1	Hepatotoxicidade ligeira	15 (13.76)
2	Hepatite tóxica	12 (11.01)
3	Necessidade de transplante/ Morte	4 (3.67)

2.2. Extração de DNA

A extração de DNA efetuou-se a partir de 10 ml de sangue periférico colhido em tubos contendo EDTA (ácido etileno-diaminotetracético dissódico) e conservado a -20°C até à extração. Recorreu-se ao método da ureia, adaptando a técnica previamente descrita (Miller *et al.* 1988).

O isolamento do DNA foi realizado de acordo com os métodos que seguidamente se sumariam.

Após descongelamento, as amostras recolhidas foram tratadas com 40 ml de um tampão de lise de eritrócitos constituído por uma solução de PBS 1x com 0.1% de IGEPAL. Esta solução promove a lise dos eritrócitos e a libertação da hemoglobina. As amostras foram, posteriormente, colocadas num agitador automático durante 10 minutos e centrifugadas a 2500 rpm durante 20 minutos para promover a lise celular.

Desprezou-se o sobrenadante, por aspiração, e o *pellet*, contendo as células nucleadas, foi ressuspensão de novo em 40 ml da mesma solução de lise de eritrócitos.

Repetiram-se as lavagens até à obtenção de sobrenadantes límpidos, sem hemoglobina visível. A seguir, o sedimento foi ressuspensão em 1 a 6 ml de um tampão de lise de membranas, constituído por 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl,

pH=7.4, e 7 M de ureia até completa homogeneização. Adicionou-se SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), num volume correspondente a 1/5 do volume homogeneizado. Esta mistura foi incubada, *overnight*, a 37°C.

Após a incubação, adicionou-se à mistura uma solução concentrada de NaCl 6 mM na proporção de 1 ml para 3.5 ml da amostra, para promover a precipitação das proteínas. Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 3500 rpm, durante 25 minutos, à temperatura ambiente. No final, recolheu-se cuidadosamente o sobrenadante e o DNA foi precipitado com a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto. Removeu-se o novelo de DNA com uma pipeta e lavou-se com etanol a 70%.

Após a evaporação do etanol, o DNA foi dissolvido em 300 µl de água bidestilada e incubado a 65°C durante 30 minutos para inativação de DNases e RNases.

As amostras foram conservadas a -20°C até nova utilização.

2.3. Quantificação do DNA

Procedeu-se à quantificação de DNA e avaliação do grau de pureza das amostras das populações em estudo, através de espectrofotometria, com leitura das absorvâncias dos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, considerando-se normal o valor compreendido entre 1.8 e 2.0. Para este efeito, utilizou-se o aparelho de espectrofotometria nanodrop (Nanodrop ND-1000).

2.4. Genotipagem do NAT2

A genotipagem do *NAT2* envolveu a sequenciação de dois *amplicons* do gene, de modo a poder identificar 10 SNPS (T111C, G191A, C282T, T341C, A434C, C481T, G590A, A803G, A845C e G857A) que permitem caracterizar um total de 23 alelos.

Para a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), os *primers* foram desenhados através do programa bioinformático Beacon Designer ® (tabela XI). Para cada amplificação, num volume final de 25 µl, usaram-se cerca de 200 ng de DNA, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0.25 µM de *primers*, tampão 1x (NZYTech) e 1 unidade de *Taq DNA polymerase* (NZYTech). Após uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C, decorreram 35 ciclos com as seguintes etapas: 30 segundos a 95°C para uma desnaturação do DNA, 30 segundos a 59°C para os *primers* hibridizarem e 30 segundos de extensão a 72°C; finalizou-se com 5 min de extensão a 72°C. Utilizou-se o termociclador “*My cycler*” (Biorad).

Tabela XI - Primers utilizados para a PCR inicial e para a PCR de sequenciação

Gene <i>NAT2</i>	Primers
1º Segmento (465 pb)	Proximal: 5'ACACGAGGAAATCAAATGCTAAAG 3' Distal: 5'CTGCCACATCTGGGAGGAG 3'
2º Segmento (547 pb)	Proximal: 5'GCTGGGTCTGGAAGCTCCTC 3' Distal : 5'TTGGGTGATACATACACAAGGG 3'

pb- pares de bases

A verificação da qualidade da amplificação foi feita por eletroforese dos produtos de PCR em agarose a 2%, tendo sido utilizados 7 µl de produto de PCR, 1 µl de *loading buffer*, 3.6 µl de brometo de etídeo e 1 µl de marcador de peso molecular.

Procedeu-se, posteriormente, à sequenciação pelo método de Sanger em sequenciador automático, *AbiPrism 3130 Genetic Analyser*.

Para preparar as amostras para a sequenciação realizaram-se três passos: purificação em coluna do produto de PCR com o kit *Jetquick* da Genomed, PCR de sequenciação e uma nova purificação em coluna, utilizando um kit da *GE Healthcare 1000 purifications Illustra™*. Para cada PCR de sequenciação (*sense* e *antisense* para cada *amplicon*) utilizaram-se 14 µL de H₂O, 2 µL de tampão (*Applied Biosystem*), 2 µL de terminadores (*BD v1.1 Applied Biosystem*), 1 µL de produto de PCR e 1 µL de cada *primer* de sequenciação (os mesmos das PCRs iniciais). A análise de resultados foi efetuada com o programa *Sequencing Analysis Software v5.2* (fig. 9):

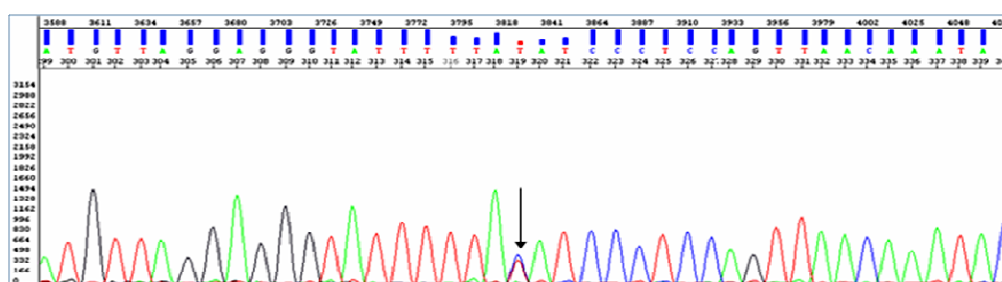


Figura 9 - Eletroferograma de sequenciação do gene NAT2. A seta assinala um ponto de heterozigotia.

A caracterização dos 10 SNPs dos dois segmentos sequenciados permite definir o genótipo de cada indivíduo e a sua classificação como AL, AI ou AR, recorrendo a tabelas com as combinações dos vários alelos (ver anexos).

2.5. Genotipagem do gene CYP2E1

Identificaram-se os polimorfismos T7632A (rs6413432) e C1053T (rs2031920) pela técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), tendo sido utilizadas para o efeito as enzimas de restrição *DraI* e *RsaI*, respetivamente. Os locais de restrição destas endonucleases encontram-se esquematizados na fig. 10.

Para a PCR, os *primers* foram desenhados através do programa bioinformático Beacon Designer® (tabela XII). Para cada reação, num volume final de 25 µl, usaram-se cerca de 200 ng de DNA, 1.5 mM de MgCl₂ (NZTtech), 200 µM de dNTPs (New England Biolabs), 0.25 µM de *primers* (Invitrogen), tampão 1x (NZYtech) e 1 unidade de Taq DNA polimerase (NZYtech). Após uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C, decorreram 35 ciclos com as seguintes etapas: 30 segundos a 95°C para uma desnaturação completa do DNA, 30 segundos de *annealing* (a 56°C para a hibridização dos *primers* que flanquearam o segmento onde se encontrava o polimorfismo C1053T, ou 30 segundos a 62°C para a hibridização dos *primers* que flaquearam o segmento onde se encontrava o polimorfismo T7632A) seguindo-se 30 segundos de extensão a 72°C; finalizou-se com 5 minutos de extensão a 72°C. Utilizou-se o termociclador “*My cycler*” da Biorad.



Figura 10 - Locais de restrição para as enzimas *RsaI* (a) e *DraI* (b). As bases polimórficas estão assinaladas a vermelho.

Tabela XII - Primers utilizados para as PCRs.

Gene <i>CYP2E1</i>	Primers
1053 C>T (412 pb)	Proximal: 5' CCAAGTCGAGTCTACAT 3' Distal: 5' TTCATTCTGTCTTCTAACTGG 3'
7632 T>A (376 pb)	Proximal: 5' AGTCGACATGTGATGGATCCA 3' Distal: 5' GACAGGGTTTCATCATGTTGG 3'

pb – pares de bases

A verificação da qualidade da amplificação foi feita por eletroforese dos produtos de PCR em agarose a 2%, tendo sido utilizados 7 µl de produto de PCR, 1 µl de *loading buffer*, 3.6 µl de brometo de etídeo e 1 µl de marcador de peso molecular.

Posteriormente, procedeu-se à digestão dos produtos com as enzimas de restrição supracitadas. 6 µl do produto de PCR de 412 pb e 9 µl do produto de 376 pb foram sujeitos à digestão a 37°C, *overnight*, com 5 U das enzimas *RsaI* e *DraI* (Invitrogen), respetivamente. Como controlos, foi feita a digestão enzimática de produtos de PCR pertencentes a indivíduos previamente genotipados por sequenciação automática. Para a visualização dos resultados, os produtos da digestão enzimática foram separados por uma eletroforese em gel de agarose a 3%, tendo sido utilizado o volume total da reação de digestão (11 µl) e 1 µl de *loading buffer*. Como controlos negativos, usaram-se produtos de PCR que não sofreram o processo de digestão enzimática.

Relativamente ao polimorfismo identificado pela *RsaI*, o alelo *1053T* não tem a sequência de restrição da enzima *RsaI*, sendo identificado pela presença do fragmento não digerido, de 412 pb; o alelo *1053C* tem a sequência de restrição pelo que é identificado pela presença de dois fragmentos, de 351 e 61 pb. Os genótipos

correspondentes a heterozigotia caracterizam-se pela presença dos 3 fragmentos (fig. 11a).

Quanto ao polimorfismo identificado pela *DraI*, o alelo 7632A não tem a sequência de restrição, sendo identificado pela presença de um fragmento de 376 pb; o alelo 7632T tem a sequência de restrição, pelo que origina dois fragmentos, de 251 e de 125 pb. Os genótipos correspondentes a heterozigotia caracterizam-se pela presença dos 3 fragmentos (fig. 11b).

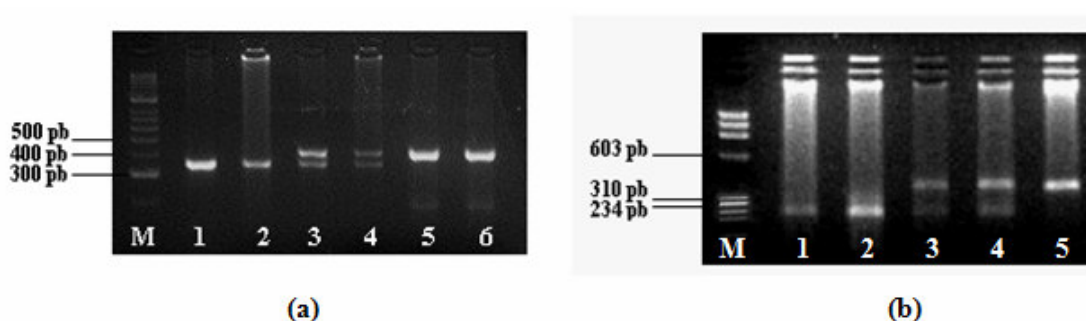


Figura 11 - Perfis de RFLPs dos polimorfismos do gene *CYP2E1*. (a) Polimorfismo 1053C>T (*RsaI*): M - HiperLadder™ II, Linhas 1 e 2 - homozigotos CC; linhas 3 e 4 - heterozigotos CT; linhas 5 e 6 - homozigotos TT. (b) Polimorfismo 7632 T>A (*DraI*): M – marcador de peso molecular, ΦX174 DNA-*HaeIII*; Linhas 1 e 2 - homozigotos TT; linhas 3 e 4 - heterozigotos TA; linha 5 - homozigóticos AA.

2.6. Genotipagem dos genes *GSTT1* e *GSTM1*

Para determinar as deleções dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foi realizada uma reação de PCR multiplex, baseada nas técnicas anteriormente descritas por Pemble *et al.* (1994) e Arand *et al.* (1996), respetivamente. Esta técnica consistiu na amplificação, em

simultâneo, de fragmentos de 215, 459 e 258 pb correspondentes a 3 genes: *GSTMI*, *GSTT1* e aquele que codifica a β -globina, que funcionou como controlo positivo.

A presença das bandas correspondentes aos genes *GSTMI* e *GSTT1* (*GSTMI*⁺ e *GSTT1*⁺) identifica a homozigotia para a presença dos genes ou de heterozigotia, enquanto que a ausência de amplificação identifica a homozigotia para as deleções (fig 12).

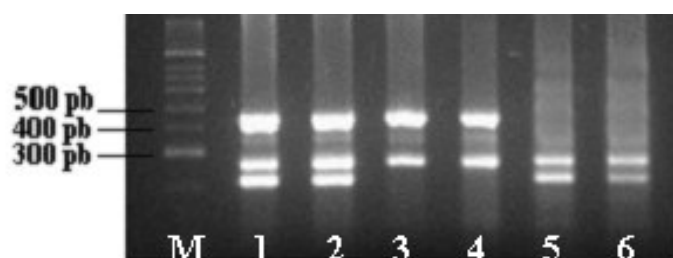


Figura 12 - PCR multiplex para os genes *GSTT1* e *GSTMI*. Os produtos de PCR de 459 pb, 258 pb e 215 pb, correspondem ao *GSTT1*, β -globina (controlo) e *GSTMI*, respetivamente; linhas 1 e 2 - presença dos genes *GSTMI* e *GSTT1*; linhas 3 e 4 - deleção em homozigotia do *GSTMI* (*GSTMI**0/*0); linhas 5 e 6: deleção em homozigotia do *GSTT1* (*GSTT1**0/*0). M- marcador de peso molecular.

Para as amostras classificadas como *GSTT1*⁺, para distinguir entre heterozigóticos e homozigóticos para a presença do gene, realizou-se uma PCR específica (*long range PCR*), anteriormente descrita por Sprenger *et al.* (2000). Os *primers* utilizados flanqueiam a deleção de 54 kb que abrange o gene *GSTT1* e, desta forma, na ausência da deleção, não ocorre amplificação; quando há deleção, ocorre amplificação de um segmento de 1460 pb (fig. 13 e 14).

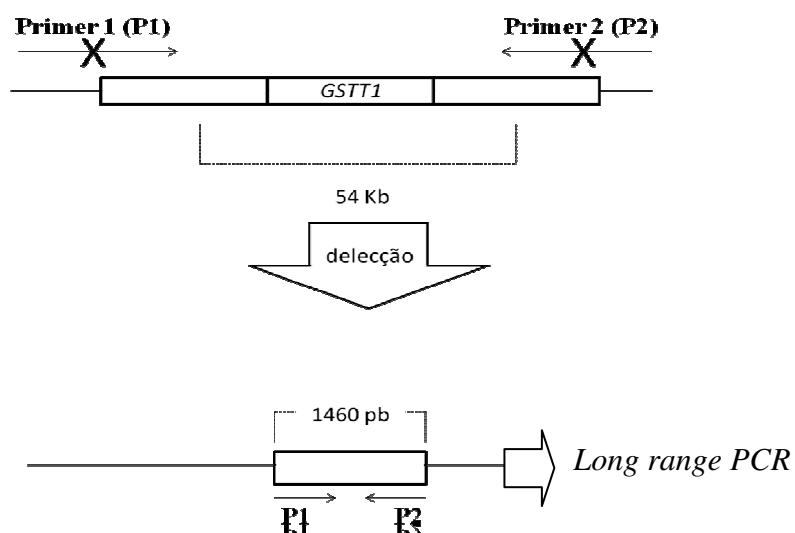


Figura 13 - Representação esquemática da amplificação do fragmento de 1460 pb resultante da deleção de 54 kb que contém o gene *GSTT1*.

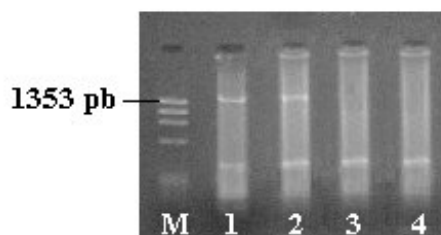


Figura 14 - Resultado de PCR que permite distinguir os homozigotos para a presença do gene dos heterozigotos para a deleção. M- marcador de peso molecular; linhas 1 e 2 – heterozigotos para a deleção; linhas 3 e 4 – homozigotos para a presença do gene.

A PCR *multiplex* foi realizada num volume total de 25 μ L, contendo 200 ng de DNA, 0,25 μ M de cada *primer* (MWG Biotech AG), tampão NZYtech (1x), 1,5 mM de $MgCl_2$ (NZYtech), 0,2 mM de cada dNTP (New England Biolabs) e 0,03 unidades de *Taq* [®] *DNA polymerase* (NZYTech). As condições de amplificação consistiram numa desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1

minuto a 58°C e 1 min a 72°C, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72°C. A separação dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em agarose a 2%, tendo sido utilizados 10 µl de produto de PCR, 1 µl de *loading buffer*, 3.6 µl de brometo de etídeo e 1 µl de marcador de peso molecular.

As amostras classificadas como *GSTT1*⁺ foram submetidas à PCR específica do *GSTT1*: utilizou-se um volume total de 25 µL, contendo 200 ng de DNA, 0,25 µM de cada *primer* (Invitrogen), tampão 1x (com 2,5 mM de MgCl₂) (Quiagen), 500 µM de cada dNTP (New England Biolabs), solução Q 1x (Quiagen) e 1 unidade de *Taq*® *DNA polymerase* (Quiagen). As condições de amplificação consistiram numa desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 64°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72°C. A presença de pelo menos um alelo nulo originou um fragmento de 1460 pb. O produto amplificado foi separado por uma eletroforese em gel de agarose a 2%, tendo sido utilizados 10 µl de produto de PCR, 1 µl de *loading buffer*, 3.6 µl de brometo de etídeo e 1 µl de marcador de peso molecular.

Os *primers* utilizados em ambas as reações de PCR encontram-se descritos na tabela XIII.

Para confirmar a especificidade do fragmento obtido pela *long range PCR* recorreu-se à sua sequenciação. Uma vez que a eletroforese revelou a existência de bandas resultantes de amplificações inespecíficas, foi necessário extrair do gel de agarose a banda correspondente ao fragmento de 1460 pb. Essa extração foi feita com o *kit NucleoSpin*[®] *Gel and PCR clean up* (Macherey-Nagel). Para limpar e concentrar o produto da *PCR*, fez-se uma purificação em coluna com o *kit DNA Clean & Concentrator*[™]- 5 (Zymo Research Corp.). Para a reação de sequenciação utilizaram-se 10 µL de H₂O, 2 µL de tampão (*Applied Biosystem*), 2.5 µL de terminadores (*BD v1.1*

Applied Biosystem), 3 µL de produto de PCR e 2,5 µL de *primer*. A análise de resultados foi efetuada com o programa *Sequencing Analysis Software v5.2*.

Tabela XIII - Primers utilizados nas PCRs.

Gene	pb	Primers	Especificidade	PCR (tipo)
<i>GSTMI</i>	219	Proximal: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3' Distal: 5' GTTGGGCTCAAATATACGGTGG 3'	<i>GSTMI</i> *A	Standard
<i>GSTTI</i>	459	Proximal: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' Distal: 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	<i>GSTTI</i> *A	Standard
	1460	Proximal: 5' CAGTTGTGAGCCACCGTACCC 3' Distal: 5' CGATAGTTGCTGGCCCCCTC 3'	<i>GSTTI</i> *0	Long range
β-globina	268	Proximal: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' Distal: 5' CAACTTCATCCACGTTACCC 3'	controle	Standard

pb – pares de bases

2.7. Genotipagem do gene *ABCB11*

Identificou-se o polimorfismo 1331 T>C através de uma PCR, seguida de uma análise de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), tendo sido utilizadas para o efeito a enzima de restrição *HaeIII*, que reconhece o local de restrição esquematizado na figura 15:

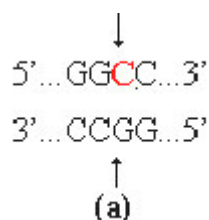


Figura 15 - Local de restrição para a enzima *HaeIII*. A base polimórfica está assinalada a vermelho.

Os *primers* foram desenhados através do programa bioinformático Beacon Designer ® e encontram-se descritos na tabela XIV. Para cada reação, num volume final de 25 µl, usaram-se cerca de 200 ng de DNA, 1.5 mM de MgCl₂ (New England Biolabs), 200 µM de dNTPs (New England Biolabs), 0.25 µM de *primers* (Invitrogen), tampão 1x (New England Biolabs) e 1 unidade de *Taq DNA polimerase* (New England Biolabs). Na PCR, após uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C, decorreram 35 ciclos com as seguintes etapas: 30 segundos a 95°C para uma desnaturação completa do DNA, 30 segundos a 56°C para a hibridização dos *primers* e 30 segundos de extensão a 72°C; finalizou-se com 5 min de extensão a 72°C. Utilizou-se o termociclador “*My cycler*” da Biorad.

Tabela XIV - Primers utilizados para a PCR.

Gene <i>ABCB11</i>	Pb	Primers
1331 T>C (V44A)	327	Proximal: ACACCGAGTATCAACACAAAGC Distal: CCAGGACAGTCTCAATGTATGC

pb – pares de bases

Verificou-se a existência de amplificação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose a 2%, tendo sido utilizados 7 µl de produto de PCR, 1 µl de *loading buffer*, 3.6 µl de brometo de etídeo e 1 µl de marcador de peso molecular.

Posteriormente, os produtos de PCR (9 µl) foram sujeitos à digestão a 37°C, *overnight*, com 3 unidades da enzima *HaeIII* (Takara Bio Inc.). Como controlo, foi feita a digestão enzimática de produtos de PCR pertencentes a indivíduos previamente genotipados por sequenciação automática. Os produtos da restrição foram separados por uma eletroforese em gel de agarose a 3% (fig. 16), tendo sido utilizado o volume total

da reação de digestão (11 µl) e 1 µl de *loading buffer*. Como controlos negativos, usaram-se produtos de PCR que não sofreram o processo de digestão enzimática.

O alelo 1331C tem a sequência de restrição, pelo que origina dois fragmentos, de 207 e 120 pb; o alelo 1331T não tem a sequência de restrição, sendo identificado pela presença de um fragmento não digerido de 327 pb. O genótipo correspondente a heterozigotia identifica-se pela presença dos 3 fragmentos.

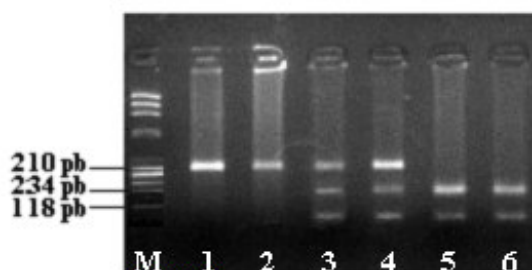


Figura 16 - Identificação do polimorfismo 1457 T>C do gene *ABCB11* por RFLP. M - Φ X174 DNA-HaeIII; linhas 1 e 2: homozigóticos TT; linhas 3 e 4 - heterozigotos TC; linhas 5 e 6 - homozigóticos CC.

2.8. Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o teste do χ^2 para variáveis descontínuas e o teste *t* de student para variáveis contínuas. Um valor *P* inferior a 0.05 foi considerado como significativo. Calculou-se igualmente o *odd ratio* com um intervalo de confiança de 95%.

Verificou-se que a população estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os genes estudados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da população

Este estudo envolveu 109 doentes com TB, 31 (28.4%) dos quais desenvolveram HT.

Na tabela XV encontram-se representados alguns fatores descritos como sendo de risco para a ocorrência de HT, como o consumo de álcool, café e tabaco, o sexo feminino e a idade avançada. No grupo de doentes sem HT, constituído por 78 indivíduos, 29,49% eram do sexo feminino, 53,85% eram (ou tinham sido) consumidores de álcool, 52,56% eram fumadores ou antigos fumadores e 20,51% tinham idade superior a 60 anos. No grupo de doentes com HT, constituído por 31 doentes, 29,05% eram do sexo feminino, 45,16% eram (ou tinham sido) consumidores de álcool, 41,94% eram fumadores ou antigos fumadores, e 35,48% tinham idade superior a 60 anos. Pela consulta do processo dos doentes, sabemos também que não havia alterações da função hepática com repercussão nos resultados analíticos. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos em relação aos fatores estudados ($p > 0.05$), pelo que concluímos que outros fatores influenciaram a ocorrência de HT.

Alguns estudos demonstraram que a ingestão de álcool é um fator de risco significativo para a HT induzida por fármacos. Pande *et al.* (1996) verificaram que o consumo de álcool estava presente em 19,8% dos indivíduos com HT e em apenas 4,9% dos controlos. No nosso estudo, o consumo de álcool não se associou a uma suscetibilidade a HT.

Teleman *et al.* (2002) verificaram uma associação significativa entre fatores como a idade avançada (OR 1.97, 95%IC 1.14-3.34, $P = 0.01$) e o sexo feminino (OR

1.9, 95%IC 1.07-3.4, $P = 0.02$) e a ocorrência de HT. Segundo os nossos resultados, os indivíduos com idade superior a 60 anos têm um aumento do risco de HT 2.13 vezes em relação a indivíduos mais novos, embora sem significado estatístico (OR=2.13; 95% IC= 0.9-5.3). O sexo feminino não mostrou estar associado a suscetibilidade a HT, o que poderá dever-se à presença de um reduzido número de mulheres da nossa população

Tabela XV – Características das populações de doentes com e sem hepatotoxicidade.

Características	Com HT \geq 1 N (%)	Sem HT N (%)	P	OR (95%IC)
Consumo de álcool				
Sim	14 (45.16)	42 (53.85)	<i>NS</i>	
Não	17 (54.84)	36 (46.15)		
Hábitos tabágicos				
Sim	13 (41.94)	41 (52.56)	<i>NS</i>	
Não	18 (58.06)	37 (47.43)		
Sexo				
Feminino	9 (29.05)	23 (29,49)	<i>NS</i>	
Masculino	22 (70.97)	55 (70.51)		
Idade				
< 60 anos	20 (64.52)	62 (79.49)	<i>NS</i>	2.13 (0.9-5.3)
\geq 60 anos	11 (35.48)	16 (20.51)		

HT: Hepatotoxicidade; HT \geq 1: classificação de acordo com os graus referidos no tópico 2.1; *NS*: se $p \geq 0.05$

3.2. Fatores genéticos

A identificação de marcadores farmacogenéticos pode não só facilitar a escolha do fármaco correto como também a posologia mais indicada, permitindo aumentar a eficácia do tratamento e prevenir ou reduzir as possíveis reações adversas tóxicas.

Muitos estudos têm mostrado que os polimorfismos presentes nos genes que codificam as enzimas que participam na via metabólica da INH estão associados à suscetibilidade à HT característica deste fármaco (Huang, 2007; Sun *et al.*, 2008).

Contudo, os estudos em caucasianos que mostram esta correlação são escassos e controversos. No sentido de aplicar este conhecimento à realidade portuguesa e de contribuir para o esclarecimento dessa controvérsia, determinaram-se as frequências de polimorfismos dos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* e *ABCB11* e a sua relação com a ocorrência de toxicidade hepática induzida pela INH, numa população portuguesa de doentes sujeitos ao tratamento para a TB.

3.2.1. Gene *NAT2*

A INH é um fármaco potencialmente hepatotóxico, havendo estudos que demonstram uma associação entre o fenótipo de acetilação da enzima *NAT2* e a suscetibilidade à ocorrência de reações de HT. Alguns polimorfismos no *NAT2* estão relacionados com um défice na atividade enzimática, o que leva à formação de metabolitos hepatotóxicos resultantes do metabolismo da INH.

As frequências genótípicas dos polimorfismos do gene *NAT2* encontradas neste estudo, estão descritas na tabela XVI. Os genótipos mais frequentes na população foram o **4/5B-**5A/12A e **4/6A-**6B/13 (correspondentes ao fenótipo AI), o **5A/6C-**5B/6A e **5B/5B* (correspondentes ao fenótipo AL). As frequências de AR, AI e AL na população global foram, respetivamente, 2.75%, 44.95% e 52.29% (tabela XVII). Pelo facto de termos utilizado a metodologia de sequenciação, foram encontrados alguns alelos ainda não descritos para a população portuguesa, como o *NAT2*12A*, *NAT2*4/5B*, *NAT2*5A/12B-**5B/13, *NAT2 *13/14C* e *NAT2*6A/14B*.

As frequências genótípicas e fenotípicas encontradas neste estudo foram, no geral, semelhantes às anteriormente descritas para a população portuguesa. Um dos primeiros trabalhos foi realizado em 1998, num grupo de 128 indivíduos. Recorrendo PCR-RFLP, observaram-se 35.9% de AR (incluindo os AI) e 64.1% de AL. (Lemos & Regateiro, 1998; Lemos *et al.*, 1999).

Tabela XVI – Frequências genótípicas do *NAT2* em doentes com e sem HT.

Genótipo	Com HT N (%)	Sem HT N (%)	P	OR (95% IC)
AR				
<i>NAT2*4/4</i>	0 (0)	2 (2.56)	<i>NS</i>	
<i>NAT2*12A/12A</i>	0 (0)	1 (1.28)		
AI				
<i>NAT2*4/5A</i>	0 (0)	2 (2.56)		0.6 (0.12-2.5)
<i>NAT2*4/5B</i>	0 (0)	3 (3.84)		
<i>NAT2*4/5B - NAT2*5A/12A</i>	3 (9.68)	19 (24.36)		
<i>NAT2*4/5C</i>	1 (3.23)	0 (0)		0.7 (0.1-3.7)
<i>NAT2*4/6A - NAT2*6B/13</i>	2 (6.45)	12 (15.38)		
<i>NAT2*4/6C</i>	1 (3.23)	0 (0)	<i>NS</i>	
<i>NAT2*4/6C - NAT2*6A/12A- NAT2*6B/12B</i>	0 (0)	2 (2.56)		
<i>NAT2*5A/12B - *5B/13</i>	1 (3.23)	1 (1.28)		
<i>NAT2*6A/13</i>	1 (3.23)	0 (0)		
<i>NAT2*13/14C</i>	0 (0)	1 (1.28)		
AL				
<i>NAT2*5A/5B</i>	0 (0)	1 (1.28)		
<i>NAT2*5A/6C</i>	0 (0)	2 (2.56)		
<i>NAT2*5A/6C - NAT2*5B/6A</i>	8 (25.81)	11 (14.1)		
<i>NAT2*5B/5B</i>	2 (6.45)	11 (14.1)		
<i>NAT2*5B/5C</i>	1 (3.23)	1 (1.28)	<i>NS</i>	
<i>NAT2*5B/7B</i>	0 (0)	1 (1.28)		
<i>NAT2*5C/6A</i>	1 (3.23)	0 (0)	4.98 (1.1-21.98)	
<i>NAT2*6A/6A</i>	7 (22.58)	3 (3.84)		
<i>NAT2*6A/7B</i>	1 (3.23)	5 (6.41)		
<i>NAT2*6A/14B</i>	2 (6.45)	0 (0)		

HT: hepatotoxicidade; HT \geq 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; NS: se $p \geq 0,05$

Dividindo a amostra em doentes com e sem HT, verificou-se um predomínio de AL no grupo de doentes com HT (70.97% versus 44.87%), estatisticamente significativo (OR=3; 95% IC= 1.23-7.35) (Tabela XVII). Nenhum doente com hepatotoxicidade apresentou o fenótipo AR. Se for feita a análise da incidência de HT por fenótipo de acetilação, conclui-se que: 38,6% dos AL e 17,3% dos AI/AR desenvolveram HT. A percentagem de AL que desenvolveram HT foi semelhante àquela encontrada por Leiro-Fernandez *et al.* (2011) numa população caucasiana.

Tabela XVII - Frequências fenotípicas do *NAT2* em doentes com e sem HT.

Fenótipo <i>NAT2</i>	População geral N(%)	Com HT N (%)	Sem HT N (%)	<i>P</i>	OR (IC 95%)
AR + AI	52 (47.71)	9 (29.03)	43 (55.1)	0.01	3.0032 (1.23-7.35)
AL	57 (52.29)	22 (70.97)	35 (44.87)		

HT: hepatotoxicidade; HT \geq 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; NS: se $p \geq 0.05$

Estes resultados identificam o fenótipo de AL, e respetivos genótipos, como fatores de suscetibilidade para a hepatite tóxica induzida pela INH. Concluimos igualmente que cerca de metade dos doentes que acorrem aos cuidados de saúde são AL e têm risco acrescido de desenvolver HT.

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos entre as duas populações de doentes (Tabela XVI). No entanto, e à semelhança de um estudo na população chinesa (An *et al.*, 2012), o genótipo *6A/6A, correspondente ao fenótipo AL, mostrou estar associado ao um aumento do risco de HT 5 vezes superior (OR= 4.98; 95% IC= 1.13-21.9788).

Vários estudos realizados em diferentes populações já verificaram a existência de uma associação entre o fenótipo AL e a HT induzida pela INH (Ohno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Kinzig-Schippers *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007). Contudo, alguns estudos não observaram esta associação (Singh *et al.*, 1995; Vuilleumier *et al.*, 2006) e outros verificaram que os indivíduos com o fenótipo AR apresentavam uma maior suscetibilidade à lesão hepática induzida por fármacos anti- TB (Mitchell *et al.*, 1975).

A discrepância que existe entre diferentes estudos poderá ser explicada pelo facto de a suscetibilidade à hepatite tóxica ser influenciada por diversos fatores como a idade, o sexo, os hábitos alimentares, algumas patologias, consumo de álcool, fumo do tabaco, etc. Outro fator importante a ser considerado será a existência de diferenças das frequências dos polimorfismos das enzimas de metabolismo entre populações e etnias: a exposição a potenciais hepatotoxinas que derivam do metabolismo dos fármacos poderá ser específica para cada população. As contribuições relativas das vias alternativas podem também explicar algumas diferenças na toxicidade entre indivíduos (Leiro *et al.*, 2008).

3.2.2. Gene CYP2E1

As frequências genóticas dos polimorfismos do gene *CYP2E1* encontram-se descritas na tabela XVIII.

Estudaram-se 2 polimorfismos na região 5' do gene *CYP2E1*. Para o polimorfismo na posição -1053 (que origina perda do local de restrição da *RsaI*), o grupo de doentes sem HT apresentou frequências genóticas de 84.62%, 12.82% e 2.56% relativamente aos genótipos *c1/c1* (*wild-type*), *c1/c2* e *c2/c2*, respetivamente. Para o mesmo polimorfismo, o grupo de doentes com HT apresentou frequências

genóticas de 93.55% e 6.45% relativamente aos genótipos *c1/c1* e *c1/c2*, respetivamente. Nenhum doente com HT apresentou o genótipo *c2/c2*.

Para o polimorfismo no intrão 6, que origina perda do local de restrição para a enzima de restrição *DraI*, o grupo de doentes sem HT apresentou frequências genóticas de 74.36%, 24.36% e 1.28% relativamente aos genótipos *D/D* (*wild-type*), *D/C* e *C/C*, respetivamente. Para o mesmo polimorfismo, o grupo de doentes com HT apresentou frequências genóticas de 80.65% e 19.35% relativamente aos genótipos *D/D* e *D/C*, respetivamente. Nenhum doente com HT apresentou o genótipo *C/C*.

Os genótipos mais frequentes na população geral foram o *c1/c1* e *D/D*. Os genótipos *c2/c2* e *C/C* são os menos frequentes nesta população.

Estas frequências estão de acordo com estudos anteriores em caucasianos. Para a variante -1053 C>T, Persson *et al.* (1993) e Stephens *et al.* (1994) estimaram uma frequência de 90–92% para o genótipo *wild-type*, 1% para homozigóticos *c2/c2* e 7-9% para o genótipo heterozigótico. Para a variante 7632 T>A, Garte *et al.* (2001) verificaram uma frequência de 85.4% para o genótipo *wild-type*, 13.8% para o genótipo heterozigótico e 0.8% para homozigóticos *C/C*.

Na população de doentes com HT, os genótipos mais frequentes foram, igualmente, o *c1/c1* e *D/D* para ambos os polimorfismos. Nesta população, nenhum doente apresentou os genótipos *c2/c2* e *C/C*, mas como se tratam de genótipos raros em populações caucasianas, nada se pode concluir acerca do carácter protetor destes alelos em relação à ocorrência de HT.

O número de doentes homozigotos *c2/c2* foi muito reduzido para análise isolada, pelo que se avaliou conjuntamente com os heterozigotos *c1/c2*. O mesmo sucedeu com os doentes homozigotos para o alelo C, tendo a avaliação sido feita em conjunto com os heterozigotos *D/C*. Dessa análise, conclui-se que não houve diferenças estatisticamente

significativas na distribuição dos genótipos entre as duas populações de doentes. Contudo, o genótipo *wild-type* para as duas variantes é o genótipo mais associado a um aumento do risco de HT: este é 2.6 vezes superior em homocigóticos *wild-type* para a variante -1053C>T (OR=2.6; 95%IC=0.6-12.5), e 1.4 vezes superior em homocigóticos *wild-type* para a variante 7632T>A (OR=1.4; 95%IC=0.5- 4). Esta associação também se verificou em estudos anteriores de meta-análise (Sun *et al.*, 2008) ou ainda num estudo de Huang *et al.* (2003), tendo-se verificado resultados estatisticamente significativos.

Tabela XVIII – Frequências genotípicas dos polimorfismos do *CYP2E1* em doentes com e sem HT.

Genótipo <i>CYP2E1</i>	Global N (%)	Com HT N (%)	Sem HT N (%)	P	OR (95% IC)
-1053 C>T (Rsa-)					
<i>c1/c1</i>	95 (87.16)	29 (93.55)	66 (84.62)	NS	2.6 (0.6-12.5)
<i>c1/c2</i>	12 (11.01)	2 (6.45)	10 (12.82)		
<i>c2/c2</i>	2 (1.83)	0 (0)	2 (2.56)		
<i>c1/c2 + c2/c2</i>	14 (12.84)	2 (6.45)	12 (15.38)		
7632 T>A (Dra-)					
<i>D/D</i>	83 (76.15)	25 (80.65)	58 (74.36)	NS	1.4 (0.5- 4)
<i>D/C</i>	25 (22.94)	6 (19.35)	19 (24.36)		
<i>C/C</i>	1 (0.92)	0 (0)	1 (1.28)		
<i>D/C + C/C</i>	26 (23.85)	6 (19.35)	20 (25.64)		

HT: hepatotoxicidade; HT \geq 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; NS: se $p \geq 0,05$

Alguns estudos demonstraram que polimorfismos no gene *CYP2E1* resultavam numa diminuição da atividade da enzima no fígado. Desta forma, o alelo selvagem para aquele gene seria responsável pela atividade total da enzima, favorecendo assim a formação de metabolitos tóxicos e, conseqüentemente, levando à lesão hepática (Sun *et al.* 2008).

Relativamente aos polimorfismos do *CYP2E1*, a correlação genótipo/fenótipo não é linear o que se prende com o complexo controlo da expressão deste gene. Sabe-se que, por exemplo, o álcool induz a expressão do *CYP2E1*, criando fenocópias, de genótipos de metabolizadores rápidos.

3.2.3. Genes *GSTM1* e *GSTT1*

Os genes *GST* codificam enzimas da fase II do metabolismo que catalisam a conjugação da glutationa com substratos eletrofílicos, inativando ou diminuindo assim o potencial tóxico do xenobiótico (Bolt & Thier, 2006; Huang, 2007). Durante a metabolização da INH, as enzimas *GSTM1* e *GSTT1* participam na destoxificação de metabolitos tóxicos produzidos pela *CYP2E1* durante a fase I do metabolismo. Apesar da sua relevância biológica, uma elevada percentagem da população tem deleções em homozigotia para os genes *GSTM1* e *GSTT1* (Bolt & Thier, 2006). As deleções destes genes poderão estar envolvidas na suscetibilidade a HT induzida por fármacos, embora os estudos existentes mais uma vez sejam controversos (Roy *et al.* 2001, Huang *et al.* 2007, Leiro *et al.* 2008).

As frequências genótípicas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* encontradas na nossa amostra populacional estão descritas na tabela XIX.

No conjunto dos doentes, encontrámos uma frequência de 49.54% para a deleção em homozigotia do *GSTM1* (*GSTM1**0/0; habitualmente designado por genótipo nulo) e de 9.17% para a deleção em homozigotia do *GSTT1* (*GSTT1**0/0; habitualmente designado por genótipo nulo). A frequência encontrada neste estudo para o genótipo nulo do *GSTM1* foi semelhante às anteriormente descritas para diferentes populações caucasianas europeias (Garte *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2008). Contudo, para o gene

GSTT1, a frequência do genótipo *GSTT1**0/0 é das mais baixas descritas em populações caucasianas, aproximando-se apenas dos valores registados por *Roy et al.* (2008) em indivíduos hispânicos (10-12%).

O grupo de doentes sem HT apresentou frequências genótípicas de 50% relativamente ao genótipo *GSTMI* positivo (*GSTMI**A/A ou *A/0) e 50% relativamente ao genótipo nulo. O grupo de doentes com HT apresentou frequências genótípicas de 51.61% relativamente ao genótipo *GSTMI* positivo, e 48.39% relativamente ao genótipo nulo. Não se verificaram, portanto, diferenças estatisticamente significativas.

Para o *GSTT1*, utilizámos dois protocolos que nos permitiram discriminar, entre os *GSTT1* positivos, os homozigotos para a presença do gene (*GSTT1**A/A) dos heterozigotos para a deleção (*GSTT1**A/0). O grupo de doentes sem HT apresentou frequências genótípicas de 38.46% para o genótipo *GSTT1**A/A, 52.56% para o genótipo *GSTT1**A/0 e 8.97% para o genótipo *GSTT1**0/0. No grupo de doentes com HT, as frequências genótípicas encontradas foram de 29.03% para o genótipo *GSTT1**0/0, 61.29% para o genótipo *GSTT1**A/0 e 9,68% para o genótipo *GSTT1**0/0. Também para este gene não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

Avaliou-se ainda o efeito da presença de pelo menos uma deleção em homozigotia no *GSTMI* e/ou *GSTT1* na suscetibilidade para a ocorrência de HT, mas não se verificaram diferenças estatisticamente significativas. Como o número de indivíduos homozigotos para a deleção do *GSTT1* era muito reduzido, não foi possível avaliar a presença dos dois genótipos nulos em simultâneo.

Concluimos, portanto que nenhum dos polimorfismos estudados dos genes *GSTMI* e *GSTT1* podem ser considerados fatores de suscetibilidade para a HT induzida pela INH.

Tabela XIX – Frequências genotípicas dos polimorfismos do *GSTM1* e *GSTT1* em doentes com e sem HT.

Genótipos	População geral N (%)	Com HT N (%)	Sem HT N (%)	P
<i>GSTM1</i>				
*A/A + *A/O	55 (50.46)	16 (51.61)	39 (50)	NS
*O/O	54 (49.54)	15 (48.39)	39 (50)	
<i>GSTT1</i>				
*A/A	39 (35.78)	9 (29.03)	30 (38.46)	NS
*A/O	60 (55.05)	19 (61.29)	41 (52.56)	
*O/O	10 (9.17)	3 (9.68)	7 (8.97)	

HT: hepatotoxicidade; HT \geq 1: classificação de acordo com os graus referidos no tópico 2.1; NS: se $p \geq 0.05$

Poucos estudos demonstraram a correlação entre os genótipos nulos e a HT induzida pela INH (Roy *et al.* 2001; Huang *et al.* 2007, Leiro *et al.* 2008). Roy e colaboradores (2001) encontraram uma associação significativa com a deleção em homozigotia para o gene *GSTM1* numa população indiana e, mais recentemente, Huang e colaboradores (2007) encontraram resultados semelhantes num estudo numa população chinesa. Contudo, em ambos os estudos, não se verificou a associação com a deleção em homozigotia para o *GSTT1*. Um estudo com população espanhola verificou uma elevada associação entre o genótipo nulo para *GSTT1* e a HT induzida pela INH, e ausência de associação significativa com o genótipo nulo para o *GSTM1* (Leiro *et al.*, 2008).

Mais uma vez a controvérsia dos resultados pode prender-se com vários fatores, como as diferenças das frequências dos vários polimorfismos em populações de etnias diferentes, o reduzido número de doentes ou a interferência de fatores ambientais como o consumo alcoólico. Outro fator importante a ser considerado é a complementaridade funcional das enzimas da superfamília GST. O défice funcional das *GSTT1* e *GSTM1*,

causado pelas deleções dos respectivos genes, pode ser colmatado por outras enzimas da mesma superfamília.

3.2.4. Gene ABCB11

A BSEP desempenha um papel crucial na eliminação de substratos endógenos, como os sais biliares, e de diversos xenobióticos. Polimorfismos no gene que codifica a BSEP estão envolvidos na ocorrência de reações adversas a fármacos, uma vez que comprometem a função daquela proteína transportadora, expondo os hepatócitos aos sais biliares e a metabolitos tóxicos resultantes do metabolismo de fármacos.

No presente estudo pretendemos verificar se a variante 1331 T>C (V444A) no gene que codifica a BSEP (gene *ABCB11*) poderá ser um marcador genético de previsão da ocorrência de HT induzida pela INH.

As frequências genótípicas do polimorfismo 1331 T>C em doentes com e sem HT encontram-se descritas na tabela XX.

O genótipo mais frequente na amostra global da população foi a heterozigotia *Val/Ala*, presente em 57.8% dos doentes. A frequência do genótipo homozigótico para a variante (*Ala/Ala*) foi de 30.28% e a frequência de homozigotos *Val/Val* foi de 11.93%. Estas frequências são semelhantes às encontradas por Lang *et al.* para uma população caucasiana: 49.3% para o genótipo *Val/Ala*; 32.2% para genótipo *Ala/Ala* e 18.5% relativamente ao genótipo *Val/Ala* (Lang *et al.*, 2007).

O grupo de doentes sem HT apresentou frequências genótípicas de 11.54%, 62.82% e 25.64% relativamente aos genótipos *Val/Val*, *Val/Ala* e *Ala/Ala*. O grupo de doentes com HT apresentou frequências genótípicas de 12.9%, 45.16% e 41.94% relativamente aos genótipos *Val/Val*, *Val/Ala* e *Ala/Ala*.

Não houve diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos entre as duas populações de doentes. Contudo, o genótipo *Ala/Ala* está associado a um aumento do risco de HT 2 vezes superior comparativamente com os outros genótipos, mas sem significado estatístico (OR=2.1; 95%IC=0.9-5).

Tabela XX - Frequências genotípicas do polimorfismo 1331 T>C do gene *ABCB11* em doentes com e sem HT.

Genótipos	Global N (%)	Com HT N (%)	Sem HT N (%)	P	OR (95%IC)
<i>TT (Val/Val)</i>	13 (11.93)	4 (12.9)	9 (11.54)	NS	2.1 (0.9-5)
<i>TC (Val/Ala)</i>	63 (57.8)	14 (45.16)	49 (62.82)		
<i>CC (Ala/Ala)</i>	33 (30.28)	13 (41.94)	20 (25.64)		

HT: hepatotoxicidade; HT ≥ 1 : classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; NS: se $p \geq 0,05$

Alguns estudos verificaram a associação entre a variante V444A e o aumento do risco de lesão hepática, tipicamente esteatose, induzida por fármacos (Lang *et al.*, 2007; Dixon *et al.*, 2008), mas é a primeira vez que se estuda o papel deste polimorfismo na suscetibilidade à HT induzida pela INH.

Meier *et al.* (2008) verificaram que mulheres homozigotas para a presença do polimorfismo 1331 T>C tinham uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de colestase associada à toma de contraceptivos orais, o que sugere uma relação com a exposição a hormonas femininas

Tentámos por isso averiguar se existia uma relação entre este polimorfismo, o género feminino e a suscetibilidade à HT induzida pela INH. Compararam-se as frequências genotípicas do polimorfismo 1331 T>C do gene *ABCB11* entre homens e mulheres com HT (tabela XXI). O número de doentes homozigotos *Val/Val* foi muito reduzido para análise isolada, pelo que se avaliou conjuntamente com os heterozigotos *Val/Ala*. Verificou-se que o genótipo *Ala/Ala* estava associado a um aumento do risco

de HT 2,19 vezes superior em mulheres, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (OR= 2.19; 95% IC= 0.45-10.58).

Tabela XXI - Frequências genóticas do polimorfismo 1331 T>C do gene *ABCB11* em doentes com e sem HT.

Genótipos	Homens com HT≥1 N (%)	Mulheres com HT≥1 N (%)	P	OR (95% IC)
<i>TT (Val/Val) + TC (Val/Ala)</i>	14 (63.64)	4 (44.44)	<i>NS</i>	
<i>CC (Ala/Ala)</i>	8 (36.36)	5 (55.55)		2.19 (0.45-10.58)

HT: hepatotoxicidade; HT ≥ 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; *NS*: se $p \geq 0,05$

A ausência de significado estatístico poder-se-á dever ao reduzido número de mulheres em estudo e à falta de dados clínicos, nomeadamente do estado hormonal dessas mulheres. De facto, desconhece-se a percentagem de mulheres que tomavam contraceptivos orais, ou que tenham tido alterações dos níveis hormonais de outra natureza. Esperamos que o aumento da amostra de doentes permita, no futuro, resultados mais conclusivos.

3.3. Hepatotoxicidade em doentes sem genótipo de risco

Com o objetivo de explicar a ocorrência de hepatotoxicidade em doentes sem o genótipo correspondente ao fenótipo AL (o único que mostrou ser um fator de suscetibilidade) analisou-se a influência de outros fatores como o consumo de álcool, de café, os hábitos tabágicos, o género, a idade e a pré-existência de patologias em doentes com fenótipo de acetilação intermédia (tabela XXII). Recordamos que nenhum dos doentes com HT era AR.

Tabela XXII - Características dos doentes com fenótipo de AI, com e sem HT.

Características	AI com HT \geq 1 N (%)	AI sem HT N (%)	P	OR (95% IC)
Consumo de álcool				
Sim	5 (55.56)	18 (45)	NS	1.53 (0.36-6.55)
Não	4 (44.44)	22 (55)		
Consumo de tabaco				
Sim	3 (33.33)	21 (52.5)	NS	-
Não	6 (66.67)	19 (47.5)		
Sexo				
Feminino	3 (33.33)	14 (35)	NS	-
Masculino	6 (66.67)	26 (65)		
Idade				
< 60 anos	8 (88.89)	32 (80)	NS	-
\geq 60 anos	1 (11.11)	8 (20)		
Patologias				
Sim	6 (66.67)	22 (55)	NS	1.6 (0.36-7.5)
Não	3 (33.33)	18 (45)		

AI: acetiladores intermédios; HT: hepatotoxicidade; HT \geq 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; NS: se $p \geq 0,05$

Verificou-se que na população de AI, o consumo de álcool estava associado a um aumento do risco de HT 1.53 vezes superior, contudo a diferença não foi estatisticamente significativa (OR=1.53; 95% IC=0.36-6.55). É de salientar que este aumento apenas se verificou na população de doentes com este fenótipo de acetilação, não se tendo verificado na população global de doentes (tabela XV), o que sugere que este fator possa ser mais significativo nos doentes AI.

Verificou-se, também, que a pré-existência de patologias estava associada a um aumento do risco de HT 1.64 vezes superior, mas igualmente sem significado estatístico (OR=1.64; 95% IC= 0.36-7.48). Os doentes AI com HT tinham uma maior percentagem de patologias sistémicas comparativamente com AI sem HT (83.33% vs 68.18%), o que se poderá relacionar com algum grau de insuficiência hepática incipiente. Além disso, doentes com patologias sistémicas são frequentemente sujeitos a uma medicação que poderá potenciar a toxicidade dos fármacos usados na terapêutica da TB.

. Uma vez que a ocorrência de HT poderá estar associada à presença de outros genótipos de risco, investigou-se a possível influência dos genes *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *ABCB11*, na ocorrência de HT em doentes AI (tabela XXIII).

Não houve diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos entre as duas populações de doentes com fenótipo AI. Os resultados foram muito semelhantes aos já descritos para a população global, verificando-se, nos doentes com HT, uma maior frequência dos genótipos *c1/c1* do *CYP2E1* e do genótipo *Ala/Ala* do gene *ABCB11*, tal como anteriormente descrito.

Tabela XXIII – Associação dos genótipos dos *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *ABCB11* com a presença ou ausência de HT em doentes com o fenótipo AI.

Genótipos	AI com HT ≥ 1 N (%)	AI sem HT N (%)	P	OR (95% IC)
<i>CYP2E1</i> (-1053 C>T)				
<i>c1/c1</i>	9 (100)	35 (87.5)	NS	
<i>c1/c2</i>	0 (0)	5 (12.5)		
<i>c2/c2</i>	0 (0)	0 (0)		
<i>CYP2E1</i> (7632 T>A)				
<i>D/D</i>	8 (88.89)	29 (72.5)	NS	3.03 (0.3-27.2)
<i>D/C</i>	1 (1.11)	10 (25)		
<i>C/C</i>	0 (0)	1 (2.5)		
<i>D/C</i> + <i>C/C</i>	1 (1.11)	11 (27.5)		
<i>GSTT1</i>				
<i>*A/A</i>	3 (33.33)	15 (37.5)	NS	1.2 (0.3-5.5)
<i>*A/O</i>	5 (55.56)	21 (52.5)		
<i>*O/O</i>	1 (1.11)	4 (10)		
<i>*A/O</i> + <i>*O/O</i>	6 (66.67)	25 (62.5)		
<i>GSTM1</i>				
<i>*A/A</i> + <i>*A/O</i>	7 (77.78)	23 (57.5)	NS	
<i>*O/O</i>	2 (22.22)	17 (42.5)		
<i>ABCB11</i> 1331T>C				
<i>TT (Val/Val)</i>	3 (33.33)	4 (10)	0.09	3.77 (0.8- 17.72)
<i>TC (Val/Ala)</i>	2 (22.22)	29 (72.5)		
<i>CC (Ala/Ala)</i>	4 (44.44)	7 (17.5)		

AI: acetiladores intermédios; HT: hepatotoxicidade; HT ≥ 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; NS: se p≥0,05

Um mecanismo de HT induzida por fármacos ainda mal estudado, mas que poderá explicar alguns casos de HT induzida pela INH sem que haja genótipo de risco é a ocorrência de uma reação de hipersensibilidade retardada. Embora habitualmente não explorada, manifesta-se sobretudo através de valores muito elevados de transaminases e acompanham-se de reações cutâneas sugestivas.

3.4. Ausência de hepatotoxicidade em doentes com o genótipo de risco

Dos doentes que não desenvolveram HT, quase metade tinha o genótipo/fenótipo AL. Tal como no grupo anterior, tentámos verificar a influência de outros fatores (tabela XXIV) e da interferência dos outros genótipos/epistasia (tabela XXV).

Relativamente aos fatores não genéticos não se encontraram diferenças estatisticamente significativas. Verificou-se, contudo que doentes com o fenótipo AL com idade inferior ou igual a 60 anos tinham uma menor suscetibilidade para ocorrência de HT, tendo essa diferença atingido um valor muito próximo do significado estatístico ($p=0.07$; $OR=0.4$ 95% $IC= 0.11-1.13$). Em pessoas com idade avançada há um decréscimo das funções hepáticas e renais, há maior probabilidade de existirem interações medicamentosas, o fluxo sanguíneo hepático é mais reduzido e o volume hepático também é menor. Por isso, nestas pessoas é de esperar uma maior suscetibilidade a HT.

Tabela XXIV - Características dos doentes com fenótipo AL, com e sem HT.

Características	AL com HT ≥ 1 N (%)	AL sem HT N (%)	P	OR (95% IC)
Consumo de álcool			<i>NS</i>	
Sim	9 (40.91)	22 (62.86)		
Não	13 (59.09)	13 (37.14)		
Consumo de tabaco			<i>NS</i>	-
Sim	10 (45.45)	19 (54.29)		
Não	12 (54.54)	16 (45.71)		
Sexo			<i>NS</i>	
Feminino	6 (27.27)	8 (22.86)		
Masculino	16 (72.72)	27 (77.14)		
Idade			<i>NS*</i>	0.4 (0.11-1.13)
<60 anos	12 (54.54)	27 (77.14)		
≥ 60 anos	10 (45.45)	8 (22.86)		
Patologias			<i>NS</i>	0.9 (0.29-2.58)
Sim	14 (63.64)	21 (60)		
Não	8 (36.36)	14 (40)		

*muito próximo da significância estatística; AL: acetiladores lentos; HT: hepatotoxicidade; HT ≥ 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; *NS*: se $p \geq 0,05$.

Relativamente à presença neste grupo, de outros genótipos de risco, não o pudemos confirmar, por não se ter evidenciado nenhuma associação estatisticamente significativa (tabela XXV).

Apesar do genótipo/fenótipo AL ter sido associado ao aumento do risco de HT comparativamente com os outros fenótipos, esta não é uma correlação linear, uma vez que a HT é um fenótipo multifatorial e poligénico. Isto é, cada genótipo tem uma baixa penetrância e apenas aumenta ou diminui a suscetibilidade ao fenótipo.

Tabela XXV – Associação dos genótipos dos genes *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *ABCB11* coma presença ou ausência de HT em doentes com o fenótipo AL.

Genótipos	AL com HT ≥ 1 N (%)	AL sem HT N (%)	P	OR (95%IC)
<i>CYP2E1</i> (-1053 C>T)				
<i>c1/c1</i>	20 (90.91)	28 (80)	NS	0.4 (0.08- 2.1)
* <i>c1/c2</i>	2 (9.09)	5 (14.29)		
<i>c2/c2</i>	0	2 (5.71)		
<i>c1/c2</i> + <i>c2/c2</i>	2 (9.09)	7 (20)		
<i>CYP2E1</i> (7632 T>A)				
<i>D/D</i>	17 (77.27)	26 (74.29)	NS	0.8 (0.2- 2.97)
<i>D/C</i>	5 (22.73)	9 (25.71)		
<i>C/C</i>	0 (0)	0 (0)		
<i>GSTT1</i>				
* <i>A/A</i>	6 (27.27)	14 (40)	NS	0.6 (0.18-1.8)
* <i>A/0</i>	14 (63.64)	19 (54.29)		
* <i>0/0</i>	2 (9.09)	2 (5.71)		
* <i>A/0</i> + * <i>0/0</i>	16 (72.72)	21 (60)		
<i>GSTM1</i>				
* <i>A/A</i> + * <i>A/0</i>	9 (40.91)	14 (40)	NS	
* <i>0/0</i>	13 (59.09)	21 (60)		
<i>ABCB11</i> 1331T>C				
<i>TT (Val/Val)</i>	1 (4.5)	4 (11.43)	NS	0.4 (0.4-3.5)
<i>TC (Val/Ala)</i>	12 (54.55)	19 (54.29)		
<i>CC (Ala/Ala)</i>	9 (40.91)	12 (34.29)		

AL: acetiladores lentos; HT: hepatotoxicidade; HT ≥ 1: classificação de acordo com os critérios de avaliação referidos no tópico 2.1; NS: se p≥0,05.

3.5. Conclusões e perspetivas futuras

A amostra de população estudada incluiu 109 doentes com tuberculose, 31 dos quais (28.4%) desenvolveram HT atribuída à INH. Se excluirmos as hepatites ligeiras (grau 1), esta complicação ocorreu em 14.68% dos doentes, o que está de acordo com o descrito a nível mundial. Dos fatores de risco clínicos descritos por outros autores,

como idade mais avançada, hábitos alcoólicos ou disfunção hepática prévia, na nossa população nenhum se confirmou.

Dos vários polimorfismos analisados, só os do gene *NAT2* que determinam um fenótipo AL se associaram a um aumento de suscetibilidade para a ocorrência de HT pela INH (OR: 3.0, 95%IC de 1.23-7.35). Dos vários genótipos, o *NAT2*6A/6A* foi o que se revelou de maior risco (OR: 4.98, 95%IC de 1.1-21.98). Segundo o estudo das frequências genóticas na amostra global de doentes, pelo menos 50% dos doentes que recorrem aos serviços de saúde têm um genótipo de risco.

Não pudemos confirmar que a perda funcional das *GSTM1* e *GSTT1*, por deleções em homozigotia dos respetivos genes, ou os polimorfismos da *CYP2E1* associados a um aumento da sua função que, teoricamente, podem contribuir para HT da INH, tivessem uma contribuição relevante. Os resultados da genotipagem do gene *ABCB11* sugeriram uma interessante relação com a suscetibilidade para a hepatotoxicidade no sexo feminino, o que está de acordo com a associação conhecida entre este polimorfismo e reações de colestase em mulheres sob contraceptivos orais.

A controvérsia dos resultados obtidos pelos vários autores pode ter várias explicações. Desde logo, o facto de o fenótipo estudado, a HT pela INH, ser um fenótipo complexo, dependente quer de fatores ambientais quer de fatores genéticos. Como neste tipo de fenótipos cada um dos fatores genéticos tem uma baixa penetrância, e para se evidenciar a sua participação, é necessário estudar grandes amostras populacionais, o que geralmente só é possível por meta-análises ou pela formação de consórcios entre centros de investigação. Esperamos que a nossa contribuição possa vir a ser útil numa futura meta-análise. Por outro lado, sabe-se que muitas das enzimas polimórficas envolvidas têm uma expressão dependente de complexos mecanismos de regulação, com fácil indução e inibição por xenobióticos, e consequente criação de

fenocópias que dificultam a correlação genótipo/fenótipo. Para que os resultados possam ser mais conclusivos terá igualmente de se implementar na prática clínica metodologias para exclusão do diagnóstico de reações de hepatotoxicidade por mecanismos imunológicos.

Pensamos que, a exemplo do que tem sido tentado para outros fármacos, também na terapêutica da INH poderia ser útil a determinação de um modelo integrado de risco que servisse de apoio à decisão terapêutica. Um passo necessário será a realização de estudos prospetivos para avaliar a utilidade da genotipagem do *NAT2*, na individualização da terapêutica da isoniazida. É também crucial que se invista mais no estudo funcional de muitas das variantes genéticas identificadas como possíveis fatores de risco, para se compreenda a correlação causa/efeito.

4. BIBLIOGRAFIA

An, HR *et al.* *NAT2* and *CYP2E1* polymorphisms associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese patients. *in Clin Exp Pharmacol Physiol*, Vol. 39, N° 6, (2012) p. 535–543.

Andrade, RJ *et al.* Pharmacogenomics in drug induced liver injury. *in Current Drug Metabolism*, Vol.10 N°9 (2009) p. 956-970.

Arand, M *et al.* A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms. *in Anal. Biochem.* Vol. 236, N°1 (1996) p. 184-186.

ATS. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *in Am J Respir Crit Care Med*; Vol. 161 (2000) p. 1376-95.

Benowitz, NL; Jacob, PI & Saunders, S. Carbon monoxide, cigarette smoke and *CYP2E1* activity. *in Abstracts, 100th Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacol Therapy* (1999) p. 154.

Blair, IA *et al.* Plasma hydrazine concentrations in man after isoniazid and hydralazine administration. *Hum. Toxicol.* Vol. 4 (1985) p. 195–202.

Blum, M *et al* Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol.* Vol. 9 (1990) p. 193-203.

Bolt, HM & Thier, R Relevance of the deletion polymorphisms of glutathione S-transferases *GSTT1* and *GSTM1* in pharmacology and toxicology. *Current Drug Metabolism.* Vol. 7 (2006) p. 613-28;

Boyer, TD The glutathione-S-transferase: an update. *Hepatology.* Vol. 20 (1989) p. 585–99.

Brady JF et al. Effects of disulfiram on hepatic P450IIE1, other microsomal enzymes and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* Vol. 108 (1991) p. 366–373.

Caminero, JA Comentarios a la reciente normativa de tratamiento de la tuberculosis de ATS/CDC/IDSA. *Arch Bronconeumol.* Vol. 39 (2003) p. 379-381.

Carrière, V et al. Human cytochrome P450 2E1: From genotype to phenotype. *Pharmacogenetics.* Vol. 6 (1996) p. 203–211.

Carvalho, T et al. Polimorfismos do *NAT2*, *GSTs*, *CYP2E1* e *ABCB11* e hepatotoxicidade induzida pela isoniazida. Comunicação oral apresentada no 3º Congresso de Pneumologia do Centro (2012).

Chao, Y et al. An investigation of whether polymorphisms of cytochrome p4502e1 are genetic markers of susceptibility to alcoholic end-stage organ damage in a chinese population. *Hepatology,* Vol. 22 (1995) p. 1409–1414.

Cho et al. Genetic polymorphisms of *NAT2* and *CYP2E1* associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis,* Vol. 87 (2007) p. 551-556.

Coll, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin,* Vol. 21 (2003) p. 299-308.

Conte Jr, J et al. Effects of gender, AIDS, and acetylator status on intrapulmonary concentrations of isoniazid. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy,* Vol. 46, N°8 (2002) p.2358-2364.

Crettol, S et al. Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Metabolism. *Current Pharmaceutical Design,* Vol. 16 (2010) p. 204-219.

Deguchi, T; Mashimo, M & Suzuki, T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem.* Vol. 265 (1990) p. 12757–12760.

- Deretic, V et al.** The extreme sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to the front-line antituberculosis drug isoniazid. *Nat Biotechnol.* Vol. 14 (1996) p. 1557–1561.
- Dixon, PH et al.** Contribution of Variant Alleles of ABCB11 to Susceptibility to Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Gut*, Vol. 58, N°4 (2008) p. 537-44.
- Domínguez-Castellano, A et al.** Guía de práctica clínica de la Sociedad Andaluza de Efermedades Infecciosas (SAEI) sobre el tratamiento de la tuberculosis. *Eferm Infecc Microbiol Clin.* Vol. 25, N°8 (2007) p. 519-534.
- Donald, PR et al.** The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid. *Clin Infect Dis* Vol. 39. (2004) p. 1425–1430.
- Donald, PR et al.** Early bactericidal activity of antituberculosis agents. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* Vol. 1 (2003) p. 141-155.
- Dossing, M et al.** Liver injury during antituberculosis treatment: an 11-year study. *in Tuber Lung Dis.* Vol. 77 (1996) p. 335–340.
- Duarte, R et al.** Tratamento da tuberculose latente: revisão das normas, 2006. *in Revista Portuguesa de Pneumologia*, Vol. 13, N°3 (2007).
- Durant, F; Jebrak, G et al.** Hepatotoxicity of antitubercular treatments. Rationale for monitoring liver status. *in Drug Saf.* Vol. 16 (1996) p. 394-405.
- Enans, DAP.** N-Acetyltransferase. *in Pharmacol. Ther.* Vol. 42 (1989) p. 157–234.
- Farrell, GC.** Drug-induced acute hepatitis. *in: Farrell GC, ed. Drug-induced liver disease.* Edinburgh: Churchill Livingstone (1994) p. 247-299.
- Fernández-Villar, A et al.** The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *in Int J Tuberc Lung Dis.* Vol. 8 (2004) p. 1499–505;
- Fauci et al.** *Harrison Medicina Interna.* 17ª edição (2008) Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil.

- Fretland, AJ *et al.*** Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *in* *Pharmacogenetics*. Vol. 11, N° 3 (2001) p. 207–215.
- García, R *et al.*** Tratamiento actual de la tuberculosis. *in* *An Med Intern*; Vol. 20 (2003) p.91-100.
- Garte, S *et al.*** Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *in* *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, Vol. 10 (2001) p. 1239-48.
- George, J, Byth, K & Farrell, G.** Age but not gender selectively affects expression of individual cytochrome P450 proteins in human liver. *in* *Biochem. Pharmacol.* Vol. 50 (1995) p. 727–730.
- Ghiladi, RA *et al.*** Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG; *in* *J Am Chem Soc*, Vol. 127 (2005) p. 13428–13442.
- Giacomini, KM *et al.*** When good drugs go bad. *in* *Nature*; Vol. 446, N°7139 (2007) p. 975-977.
- Grant, DM *et al.*** Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *in* *Mol. Pharmacol.* Vol. 39, N°2 (1991) p. 184-191.
- Grant, DM *et al.*** Human acetyltransferase polymorphisms. *in* *Mutat Res*; Vol. 376, N° 1 e 2 (1997) p. 61–70.
- Hayashi, S, Watanabe, J & Kawajiri, K.** Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *in* *J. Biochem.* Vol. 110 (1991) p. 559–565.

Heifets, L. Drug susceptibility in the management of chemotherapy of tuberculosis, p. 89-121. *In* L. Heifets (ed.), Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections (1991). CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Hein, DW *et al.* Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type, mutant, and chimeric NAT2 allozymes. *in* Hum Mol Genet; Vol. 3 (1994) p. 729-734.

Hein, DW. N-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *in* Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol. Vol. 5, N° 4 (2009) p. 353-366.

Hickman, D *et al.* Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *in* Biochem J, Vol. 297 (1994) p. 441-445.

Hirvonen, A *et al.* The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. *in* Carcinogenesis, Vol. 14 (1993) p. 85-88.

Huang, YS *et al.* Cytochrome P450 2E1 Genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *in* Hepatology, Vol. 37 (2003) p. 924-930.

Huang, YS *et al.* Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *in* Hepatology, Vol.35, N°4 (2002) p. 883-889.

Huang, YS. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. *in* Expert Opin Drug Metab Toxicol.; Vol. 3, N°1 (2007) p. 1-8.

Huang, YS *et al.* 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. *in J. Hepatol*; Vol. 47, N° 1 (2007) p. 128-134.

Hustert, E *et al.* Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *in Drug Metab. Dispos*; Vol. 29 (2001) p. 1454–9.

Ingelman-Sundberg, M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *in J. Intern. Med*, Vol. 250, N°3 (2001) p. 186-200.

Iwata, R *et al.* The Role of Bile Acid Retention and a Common Polymorphism in the *ABCB11* Gene as Host Factors Affecting Antiviral Treatment Response in Chronic Hepatitis C. *in J Viral Hepat*; Vol. 18, N° 11 (2011) p. 768-778.

Jaeschke, H *et al.* Mechanisms of hepatotoxicity. *in Toxicological Sciences*; Vol. 65 (2002) p. 166–176.

Jenner, AM & Timbrell, JA. *In vitro* microsomal metabolism of hydrazine. *in Xenobiotica*; Vol. 25 (1995) p. 599–609.

Jenner, AM & Timbrell, JA. Influence of inducers and inhibitors of cytochrome P450 on the hepatotoxicity of hydrazine *in vivo*. *in Arch. Toxicol*; Vol. 68 (1994a) p. 349–57.

Jenner, AM & Timbrell, JA. Effect of acute and repeated exposure to low doses of hydrazine on hepatic microsomal enzymes and biochemical parameters *in vivo*. *in Arch. Toxicol.*; Vol. 68 (1994b) p. 240–245.

Jindani, A *et al.* The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *in Am. Rev. Respir. Dis.* Vol. 121 (1980) p. 939-949.

Keitel, V *et al.* Combined mutations of canalicular transporter proteins cause severe intrahepatic cholestasis of pregnancy. *in Gastroenterology*; Vol. 131 (2006) p. 624-629.

- Kim, R; O'Shea, D & Wilkinson, G.** Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to cyp2E1 genetic polymorphisms. *in Clin. Pharmacol. Ther.* Vol. 57 (1995) p. 645–666.
- Kimerling, M et al.** Low serum antimycobacterial drug levels in non-HIV-infected tuberculosis patients. *in Chest*; Vol. 113 (1998) p. 1178–1183.
- Kinzig-Schippers, M et al.** Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize Isoniazid doses? *in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.49, N°5 (2005) p.1733-1738.
- Kliewer, SA et al.** The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *in Endocr. Rev.*; Vol. 23 (2002) p. 687–702.
- Kubitz, R et al.** Benign recurrent intrahepatic cholestasis associated with mutations of the bile salt export pump. *in J Clin Gastroenterol*; Vol. 40 (2006) p. 171-175.
- Lang, C et al.** Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *in Pharmacogenet. Genomics*; Vol. 17, N°1 (2007) p. 47-60.
- Lee, AS et al.** Contribution of kasA analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *in Antimicrob Agents Chemother*; Vol. 43 (1999) p. 2087-2089.
- Lee, CH et al.** Isoniazid-induced fever. *in J. Formos. Med. Assoc*; Vol. 95 (1996) p. 632–634.
- Lee, S et al.** Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *in J. Biol. Chem.* Vol. 271 (1996) p. 12063–12067.
- Lee, SW et al.** NAT2 and CYP2e1 polymorphisms and susceptibility to first-line anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *in Int J Tuberc Lung Dis*; Vol. 14, N° 5 (2010) p. 622-62.

- Lee, BL *et al.*** Altered patterns of drug metabolism in patients with acquired immuno deficiency syndrome. *in Clin.Pharmacol.Ther*; Vol. 53 (1993) p. 529–35.
- Leiro, V *et al.*** Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *in Liver International*; Vol. 28, N° 6 (2008) p. 835-9.
- Leiro-Fernandez, V *et al.*** N-acetyltransferase 2 polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Caucasians. *in Int J Tuberc Lung Dis*; Vol. 15, N° 10 (2011) p. 1403–1408.
- Lemos, M & Regateiro, FJ.** N-acetyltransferase genotypes in the Portuguese population. *in Pharmacogenetics*, Vol. 8 (1998) p. 561-564.
- Lemos, M *et al.*** Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *in Carcinogenesis*; Vol. 20 (1999) p. 101-105.
- Lieber, CS.** Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *in Physiol Rev*; Vol. 77 (1997) p. 517-544.
- Lucas, D *et al.*** Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *in Pharmacogenetics*; Vol. 5 (1995) p. 298–304.
- Lucena, MI *et al.*** Glutathione S-transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. *in Hepatology*; Vol. 48, N° 2 (2008) p. 588-596.
- Maezawa, Y; Yamauchi, M & Toda, G.** Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome p450IIE1 gene and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *in Am. J. Gastroenterol*; Vol. 89 (1994) p. 561–565.

Maffei FR & Carini, M. The inhibitory effect of pyrazinamide on microsomal monooxygenase activities is related to the binding to reduced cytochrome P-450. *in Pharmacol Res Commun*; Vol. 12, N° 6 (1980) p. 523-37.

Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose, PNT, Março 2011.

Martinjak-Dvorsek, I et al. Acute isoniazid neurotoxicity during preventive therapy. *in Crit Care Med*; Vol. 28 (2000) p. 567-568.

Matthias, C et al. Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: Studies in upper aerodigestive tract cancers. *in Pharmacogenetics*; Vol. 8 (1998) p. 91–100.

McIlleron, H et al. Widespread distribution of a single drug rifampicin formulation of inferior bioavailability in South Africa. *in Int. J. Tuberc. Lung Dis.* Vol. 6 (2002) p. 356–361.

McIlleron, H et al. Determinants of Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide, and ethambutol pharmacokinetics in a cohort of tuberculosis patients. *in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 50 N°4 (2006) p. 1170-1177.

Meier, Y et al. Interindividual Variability of Canalicular ATP-Binding Cassette (ABC)-Transporter Expression in Human Liver, *in Hepatology*, Vol.44, N°1 (2006) p. 62-74.

Meier, Y et al. Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump. *in World J Gastroenterol*; Vol. 14 (2008) p. 38-45.

Meyer, UA & Zanger, UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *in Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; Vol. 37 (1997) p. 269-296.

- Miller et al.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *in* Nucleic Acids Research; Vol. 16, N° 3 (1988) p. 1215.
- Mitchell, JR et al.** Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydrazine metabolites. *in* Clin Pharmacol Ther; Vol. 18 (1975) p. 70–79.
- Mitchell, JR et al.** Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology and probable pathogenesis. *in* Ann Intern Med; Vol. 84 (1976) p. 181-192.
- Mitchison DA.** Basic mechanisms of chemotherapy. *in* Chest 76 (Suppl) (1979) p. 771–781.
- Moyer, AM et al.** Glutathione S-transferase T1 and M1: gene sequence variation and functional genomics. *in* Clin. Cancer Res.; Vol. 13, N° 23 (2007) p. 7207-7216.
- Miyoshi, H et al.** Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *in* Gastroenterology; Vol. 117 (1999) p. 669–677.
- Neafsey, P et al.** Genetic polymorphism in CYP2e1: population distribution of CYP2e1 activity. *in* Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B; Vol. 12 (2009) p. 362-388.
- Nishimura Y et al.** Inhibitory effect of anti-tuberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities. *in* J Pharmacol Sci; Vol. 96 (2004) p. 293-300.
- Ohno, M et al.** Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of INH and rifampicin-induced hepatotoxicity. *in* Int J Tuberc Lung Dis; Vol. 4, N° 3 (2000) p. 256-261.
- O’Shea, D et al.** Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity. *in* Clin. Pharmacol. Ther. Vol. 56 (1994) p. 359–367.

- Pande, JN *et al.*** Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. *in Thorax*; Vol. 51 (1996) p. 132-136.
- Parkin DP *et al.*** Trimodality of isoniazid elimination. Phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *in Am J Respir Crit Care Med*; Vol. 155 (1997) p. 1717–1722.
- Parl, FF.** Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *in Cancer Lett.* Vol. 221 (2005) p. 123-129.
- Patel, T *et al.*** Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: An overview. *in Semin. Liver Dis.* Vol. 18 (1998) p. 105–114.
- Peloquin, CA *et al.*** Population Pharmacokinetic Modeling of Isoniazid, Rifampin, and Pyrazinamide. *in Antimicrobial Agents Chemother*; Vol. 41 (1997) p. 2670-9.
- Peloquin, CA *et al.*** Pharmacokinetics of Isoniazid Under Fasting Conditions, with Food, and with Antacids. *in Int J Tuberc Lung Dis*; Vol. 3 (1999) p. 703-10.
- Peloquin, CA.** Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. *in Drugs.* Vol. 62, N° 15 (2002) p. 2169-2183.
- Pemble, S *et al.*** Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *in Biochem. J.* Vol. 300 (1994) p. 271-276.
- Persson, I *et al.*** Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *in FEBS Lett.* Vol. 319 (1993) p. 207–211.
- Polasa, K, Murthy, KJ & Krishnaswamy, K.** Rifampicin kinetics in undernutrition. *in Br. J. Clin. Pharmacol.* Vol. 17 (1984) p. 481–484.
- Raucy, J *et al.*** Induction of P-450IIE1 in the obese rat. *in Mol. Pharmacol.* Vol. 39 (1991) p. 275–280.

Ray, J; Gardiner, I & Marriott, D Managing antituberculosis drug therapy by therapeutic drug monitoring of rifampicin and isoniazid. *in Intern. Med.J.* Vol. 33 (2003) p. 229–234.

Rouse, DA et al. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *in Mol Microbiol*, Vol. 22 (1996) p. 583-592.

Roy, B et al. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 ‘null’ mutation. *in J. Gastroenterol. Hepatol*; Vol. 16 (2001) p. 1033–7.

Roy PD. Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *in Pharmacogenomics*. Vol. 9, N° 3 (2008) p. 311-21.

Russmann, S; Kullak-Ublick, GA & Grattagliano, I. Current Concepts of Mechanisms in Drug-Induced Hepatotoxicity. *in Current Medicinal Chemistry*; Vol. 16 (2009) p. 3041-3053.

Ryan, DE et al. Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. *in J. Biol. Chem.* Vol. 260 (1985) p. 6385–6393.

Salazar, D; Sorge, C & Corcoran, G. Obesity as a risk factor for drug-induced organ injury. VI. Increased hepatic P-450 concentration and microsomal ethanol oxidizing activity in the obese overfed rat. *in Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 157 (1988) p. 315–320.

Sarma GR et al. Rifampin-induced release of hydrazine from isoniazid. A possible cause of hepatitis during treatment of tuberculosis with regimens containing isoniazid and rifampin. *in Am Rev Respir Dis*; Vol. 133 (1986) p. 1072–1075.

Scales, MD & Timbrell, JA. Studies on hydrazine hepatotoxicity. 1. Pathological findings. *in J Toxicol Environ Health*; Vol. 10 (1982) p. 941-953.

- Schaberg, T; Rebhan, K & Lode, H.** Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. *in Eur Respir J*; Vol. 9 (1996) p. 2026-2030.
- Sharma, S.K. & Mohan, A.** Extrapulmonary tuberculosis. *in Indian J Med Res*; Vol. 120 (2004) p. 316-353.
- Sies, H.** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *in Am. J. Med*; Vol. 91 (1991) p. 31S–38S.
- Singh, J et al.** Antituberculosis treatment-induced hepatotoxicity: role of predictive factors. *in Postgrad Med J.*; Vol. 71, N°836 (1995) p. 359–362.
- Singh, R et al.** Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity; *in J Biol Chem*; Vol. 279 (2004) p. 43098–43106.
- Small, PM et al.** Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *in N. Engl. J. Med.*; Vol. 324 (1991) p. 289–94.
- Sodhi, CP et al.** Study of oxidative stress in isoniazid-induced hepatic injury in young rats with and without protein-energy malnutrition. *in J. Biochem. Toxicol.*; Vol. 11 (1996) p. 139–46;
- Sodhi, CP et al.** Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampicin induced hepatic injury in young rats. *in Drug Chem. Toxicol.*; Vol. 20 (1997) p. 255–69.
- Sprenger, R et al.** Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *in Pharmacogenetics*; Vol. 10 (2000) p. 557-565.
- Steele, MA et al.** Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin a meta-analysis. *in Chest*; Vol. 99 (1991) p. 465–471.

- Stephens, E et al.** Ethnic variation in the CYP2E1 gene: Polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *in* Pharmacogenetics; Vol. 4 (1994) p. 185–192.
- Strange, RC et al.** Glutathione-S-transferase family of enzymes. *in* Mutat. Res; Vol. 482, N° 1 e 2 (2001) p. 21-26.
- Strautnieks, SS et al.** A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *in* Nat.Genet. Vol. 20 (1998) p. 233–238.
- Sun, F et al.** Drug-metabolising enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *in* Int. J. Tuberc. Lung Dis. Vol. 12, N°9 (2008) p. 994-1002.
- Tafazoli, S; Mashregi, M & O'Brien, PJ.** Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model. *in* Toxicology and Applied Pharmacology; Vol. 229 (2008) p. 94–101.
- Tanaka, E.** *In vivo* age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. *in* J. Clin. Pharmacol. Ther. Vol. 23 (1998) p. 247–255.
- Tanaka, E; Terarda, M & Misawa, S.** Cytochrome P-4502E1. Its clinical and toxicological role. *in* J Clin Pharm Ther. Vol. 25 (2000) p. 165-175.
- Takahashi, T et al.** Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *in* Hepatology; Vol. 17 (1993) p. 236–245.
- Teleman, MD et al.** Hepatotoxicity of tuberculosis chemotherapy under general programme conditions in Singapore. *in* Int. J. Tuberc. Lung Dis; Vol. 6 (2002) p. 699–705.
- Tostmann, A et al.** Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review; *in* Journal of gastroenterology and Hepatology; Vol. 23 (2008) p. 192-202.

- Townsend, DM & Tew, K.** The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *in Oncogene*; Vol. 22 (2003) p. 7369–7375.
- Uematsu, F *et al.*** Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: posible relevance to low smoking exposure. *in Pharmacogenetics*; Vol. 4 (1994) p. 58-63.
- Van Crevel, R *et al.*** Low plasma concentrations of rifampicin in tuberculosis patients in Indonesia. *in Int. J. Tuberc. Lung Dis.* Vol. 6 (2002) p. 497–502.
- Vidal, R *et al.*** Tratamiento e retratamiento de la tuberculosis. *in Arch Bronconeumol*; Vol. 38 (2002) p. 441-451.
- Vuilleumier, N *et al.*** CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *in Eur j Clin Pharmacol*; Vol. 62, N° 6 (2006) p. 423-9.
- Walraven, JM *et al.*** Structure/Function Evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *in Curr Drug Metab*; Vol. 9, N° 6 (2008) p. 471-486.
- Wang, L *et al.*** Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: Variant allozyme misfolding and aggresome formation. *in PNAS*, Vol.102, N° 26 (2005) p. 9394–9399.
- Wang, L.** Pharmacogenomics: a systems approach. *in WIREs Systems Biology and Medicine*; Vol. 2 (2010) p. 3-22.
- Warrington, RJ & Olivier, SL.** Lymphocyte-mediated cytotoxicity in isoniazid associated hepatitis. *in Clin Exp Immunol.* Vol. 38 N°3 (1979) p. 561-7.
- Watanabe, J *et al.*** PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *in Nucleic Acids Res.* Vol. 18, N° 23 (1990) p. 7194.

Watanabe, J et al. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to Rsa I polymorphism in the 5'-flanking region. *in* J. Biochem. Vol. 116 (1994) p. 321–326.

Weinshilboum, R. Inheritance and Drug Response. *in* New England Journal of Medicine; Vol. 348, N° 6 (2003) p. 529-537.

Wengenack, NL et al. *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a peroxynitritase; *in* Biochem Biophys Res Commun; Vol. 256 (1999) p. 485–487.

Wong, WM et al. Anti-tuberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. *in* Hepatology; Vol. 31 (2000) p. 201-206.

Xu, SJ et al. Characterization of the human class μ glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *in* J. Biol. Chem. Vol. 273 (1998) p. 3517-3572.

Yamada, S et al. Genetic variations of NAT2 and CYP2E1 and isoniazid hepatotoxicity in a diverse population. *in* Pharmacogenomics; Vol. 10 (2009) p. 1433-1445.

Yee, D et al. Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *in* Am J Respir Crit Care Med; Vol 167 (2003) p. 1472-1477.

Yue, J et al. Effects of rifampicin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats. *in* Pharmacol Res. Vol. 59, N° 2 (2009) p. 112-9.

Youatt, J. A review of the action of isoniazid. *in* Am Rev Respir Dis; Vol. 99 (1969) p. 729–749.

Zand R et al. Inhibition and induction of cytochrome P450E1-catalyzed oxidation by isoniazid in humans. *in* Clin Pharmacol Ther; Vol. 54 (1993) p. 142-149.

Zang, Y et al. The T341C (Ile114Thr) polymorphism of N-acetyltransferase 2 yields slow acetylator phenotype by enhanced protein degradation. *in* Pharmacogenetics. Vol. 14, N° 11 (2004) p. 717-23.

Zang, Y et al. Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *in* Carcinogenesis; Vol. 28, N° 8 (2007) p. 1665–1671.

Zhang, Y; Dhandayuthapani, S & Deretic,V. Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *in* Proc Natl Acad Sci USA; Vol. 93 (1996) p. 13212–13216.

Zhang, Y et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazida resistance of *Mycobacterium tuberculosis*; *in* Nature; Vol. 358 (1992) p. 591–593.

Zhao, X et al. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *in* Biochemistry; Vol. 45 (2006) p. 4131–4140.

Zhu, Y; Doll, MA & Hein, DW. Functional genomics of C190T single nucleotide polymorphism in human N-acetyltransferase 2. *in* Biol Chem; Vol. 383, N° 6 (2002) p. 983–987.

5. ANEXOS

Genótipos *NAT2* / fenótipos de acetilação lenta:

111	191	282	341	434	481	590	803	845	857	Genotype	Phenotype
T	G	C	T	A	C	G	A	A	A	*7A/*7A	slow
T	G	C	T	A	C	A	A	A	G	*6B/*6B	slow
T	G	C	T	A	C	A/G	A	A	A/G	*6B/*7A	slow
T	G	C	T	A/C	C	G	A	A	A/G	*7A/*17	slow
T	G	C	T	A/C	C	A/G	A	A	G	*6B/*17	slow
T	G	T	T	A	C	G	A	A	A	*7B/*7B	slow
T	G	T	T	A	C	A	A	A	G	*6A/*6A	slow
T	G	T	T	A	C	A	A/G	A	G	*6A/*6C	slow
T	G	T	T	A	C	A	G	A	G	*6C/*6C	slow
T	G	T	T	A	C	A/G	A	A	A/G	*6A/*7B	slow
T	G	T	T	A	C	A/G	A/G	A	A/G	*6C/*7B	slow
T	G	C/T	T	A	C	G	A	A	A	*7A/*7B	slow
T	G	C/T	T	A	C	A	A	A	G	*6A/*6B	slow
T	G	C/T	T	A	C	A	A/G	A	G	*6B/*6C	slow
T	G	C/T	T	A	C	A/G	A	A	A/G	*6A/*7A	slow
T	G	C/T	T	A	C	A/G	A	A	A/G	*6B/*7B	slow
T	G	C/T	T	A	C	A/G	A/G	A	A/G	*6C/*7A	slow
T	G	C/T	T	A/C	C	G	A	A	A/G	*7B/*17	slow
T	G	C/T	T	A/C	C	A/G	A	A	G	*6A/*17	slow
T	G	C/T	T	A/C	C	A/G	A/G	A	G	*6C/*17	slow
T	A/G	C	T	A	C	G	A	A	A/G	*7A/*14A	slow
T	A/G	C	T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7A/*14E	slow
T	A/G	C	T	A	C	A/G	A	A	G	*6B/*14A	slow
T	A/G	C	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6B/*14E	slow
T	A/G	C	C/T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7A/*14F	slow
T	A/G	C	C/T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6B/*14F	slow
T	A/G	C	C/T	A	C/T	G	A/G	A	A/G	*7A/*14C	slow
T	A/G	C	C/T	A	C/T	A/G	A/G	A	G	*6B/*14C	slow
T	A/G	T	T	A	C	G	A	A	A/G	*7B/*14B	slow
T	A/G	T	T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7B/*14G	slow
T	A/G	T	T	A	C	A	A	A	G	*6A/*14D	slow
T	A/G	T	T	A	C	A	A/G	A	G	*6C/*14D	slow
T	A/G	T	T	A	C	A/G	A	A	G	*6A/*14B	slow
T	A/G	T	T	A	C	A/G	A	A	A/G	*7B/*14D	slow
T	A/G	T	T	A	C	A/G	G	A	G	*6C/*14G	slow
T	A/G	T	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6A/*14G	slow
T	A/G	T	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6C/*14B	slow
T	A/G	T	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6C/*14B	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	G	A	A	A/G	*7A/*14B	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	G	A	A	A/G	*7B/*14A	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7A/*14G	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7B/*14E	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	A	A	A	G	*6B/*14D	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	A/G	A	A	G	*6A/*14A	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	A/G	A	A	G	*6B/*14B	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	A/G	A	A	A/G	*7A/*14D	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6A/*14E	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6B/*14G	slow
T	A/G	C/T	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6C/*14A	slow

Genótipos *NAT2* / Fenótipos de acetilação rápida e intermédia:

1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	Genotype	Phenotype
T	G	C	T	A	C	G	A	A	G	*4/*4	rapid
T	G	C	T	A	C	G	A	A	A/G	*4/*7A	interm
T	G	C	T	A	C	G	A	A/C	G	*4/*18	rapid?
T	G	C	T	A	C	G	A	C	G	*18/*18	rapid
T	G	C	T	A	C	G	A/G	A	G	*4/*12A	rapid
T	G	C	T	A	C	G	A/G	A/C	G	*12A/*18	rapid
T	G	C	T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7A/*12A	interm
T	G	C	T	A	C	G	A/C	A	A/G	*7A/*18	interm
T	G	C	T	A	C	G	G	A	G	*12A/*12A	rapid
T	G	C	T	A	C	A/G	A	A	G	*4/*6B	interm
T	G	C	T	A	C	A/G	A	A/C	G	*6B/*18	interm
T	G	C	T	A	C	A/G	A/G	A	G	*6B/*12A	interm
T	G	C	T	A	C/T	G	A/G	A	G	4/*12C	rapid
T	G	C	T	A	C/T	G	A/G	A/C	G	*12C/*18	rapid
T	G	C	T	A	C/T	G	A/G	A	A/G	*7A/*12C	interm
T	G	C	T	A	C/T	G	G	A	G	*12A/*12C	rapid
T	G	C	T	A	C/T	A/G	A/G	A	G	*6B/*12C	interm
T	G	C	T	A	T	G	G	A	G	*12C/*12C	rapid
T	G	C	T	A/C	C	G	A	A	G	*4/*17	interm
T	G	C	T	A/C	C	G	A	A/C	G	*18/*17	interm
T	G	C	T	A/C	C	G	A/G	A	G	*12A/*17	interm
T	G	C	T	A/C	C/T	G	A/G	A	G	*12C/*17	interm
T	G	C	C/T	A	C	G	A/G	A	G	*4/*5C	interm
T	G	C	C/T	A	C	G	A/G	A/C	G	*5C/*18	Interm?
T	G	C	C/T	A	C	G	G	A	G	*5C/*12A	interm
T	G	C	C/T	A	C/T	G	A	A	G	*4/*5A	interm
T	G	C	C/T	A	C/T	G	A	A/C	G	*5A/*18	Interm?
T	G	C	C/T	A	C/T	G	A/G	A	G	*4/*5B	interm
T	G	C	C/T	A	C/T	G	A/G	A	G	*5A/*12A	interm
T	G	C	C/T	A	C/T	G	A/G	A/C	G	*5B*18	interm
T	G	C	C/T	A	C/T	G	G	A	G	*5B/*12A	interm
T	G	C	C/T	A	C/T	G	G	A	G	*5C/*12C	interm
T	G	C	C/T	A	T	G	A/G	A	G	*5A/*12C	interm
T	G	C	C/T	A	T	G	G	A	G	*5B/*12C	interm
T	G	C/T	T	A	C	G	A	A	G	*4/*13	rapid
T	G	C/T	T	A	C	G	A	A	A/G	*4/*7B	interm
T	G	C/T	T	A	C	G	A	A	A/G	*7A/*13	interm
T	G	C/T	T	A	C	G	A	A/C	G	*13/*18	rapid
T	G	C/T	T	A	C	G	A	A/C	A/G	*7B/*18	interm
T	G	C/T	T	A	C	G	A/G	A	G	*4/*12B	rapid
T	G	C/T	T	A	C	G	A/G	A	G	*12A/*13	rapid
T	G	C/T	T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7A/*12B	interm
T	G	C/T	T	A	C	G	A/G	A	A/G	*7B/*12A	interm
T	G	C/T	T	A	C	G	A/G	A/C	G	*12B/*18	rapid