

**GENOTIPAGEM DO *NAT2*:
IMPLICAÇÕES NA TERAPÊUTICA DA TUBERCULOSE COM
ISONIAZIDA NA POPULAÇÃO PORTUGUESA**

Nuno Filipe Namora Leitão Machado¹

¹Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Rua Teixeira de Pascoais – N°321, 2ºEsq.; 4800-073 Guimarães

nfnamora@gmail.com

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre do Mestrado Integrado em Medicina, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva e do Professor Doutor Carlos Robalo Cordeiro.

Aos meus Pais e ao meu irmão José Pedro

Por tudo o que sou e por tudo o que me permitiram alcançar.

Aos meus Mestres

Por todo o saber transmitido.

Aos meus Amigos e Colegas

Aos que me acompanharam, aos que estão persistentemente presentes e aos que já

fizeram parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste projecto não seria possível sem a preciosa ajuda de algumas pessoas, a quem gostaria de deixar aqui o meu humilde agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de prestar o meu profundo e reconhecido agradecimento à Exma. Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva, Professora Auxiliar de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, minha Orientadora neste projecto, a quem agradeço a disponibilidade com que aceitou tutorar este projecto, bem como a sua preciosa ajuda e empenho na orientação bibliográfica e na revisão de todos os textos constantes nesta Dissertação. Agradeço também toda a sua pedagogia que em muito contribuiu para o meu interesse pela área da Genética.

Agradeço também ao Exmo. Professor Doutor Carlos Robalo Cordeiro, Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, meu Co-orientador, por todo o apoio prestado, pela simpatia, disponibilidade, optimismo e confiança.

O meu Obrigado ao Exmo. Dr. Luís Mesquita, pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela simpatia, amizade, paciência e disponibilidade constante.

Agradeço também à Exma. Dra. Celeste Alcobia, por toda a ajuda prestada.

LISTA DE ABREVIATURAS

INH – Isoniazida

NAT2 – *N*-acetiltransferase 2

AR – Acetiladores rápidos

AL – Acetiladores lentos

AI – Acetiladores intermédios

TB – Tuberculose

PNT – Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose

OMS – Organização Mundial de Saúde

TBMR – Tuberculose multirresistente

TBXDR – Tuberculose extensamente resistente a fármacos

DOTS – *Directly Observed Therapy Short-Course*

MICs – Concentrações Inibitórias Mínimas

MBCs – Concentrações Bactericidas Mínimas

ABP – Actividade Bactericida Precoce

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

RESUMO

A farmacogenómica, que engloba actualmente o domínio da farmacogenética, constitui um importante avanço para a personalização da Medicina, possibilitando a selecção do fármaco e dose adequadas ao genótipo de cada indivíduo, o que contribui para aumentar a eficácia terapêutica e diminuir a toxicidade.

Os objectivos deste artigo de revisão consistem, em primeiro lugar, na análise das implicações da genotipagem do gene *NAT2* na terapêutica da tuberculose com isoniazida, em segundo lugar, na descrição de um estudo das frequências genotípicas do *NAT2* efectuado numa amostra de população do centro de Portugal.

A tuberculose permanece um problema à escala global, constituindo a principal causa de morte por uma doença infecciosa curável, o que justifica a necessidade contínua de investigação e a implementação de medidas que optimizem o seu tratamento. Em Portugal, apesar de se verificar uma evolução favorável, persiste ainda o problema de saúde pública, com consequências a nível humano, económico e social.

O gene *NAT2* codifica a enzima N-acetiltransferase 2, responsável pela acetilação da isoniazida, fármaco essencial à terapêutica da tuberculose. Polimorfismos do gene *NAT2* são responsáveis pelas diferenças individuais na actividade enzimática, e a sua caracterização permite a classificação da população em acetiladores rápidos, intermédios e lentos por genotipagem, e a individualização da dose terapêutica.

As concentrações séricas da isoniazida influenciam a eficácia terapêutica e, sobretudo, a sua toxicidade, a qual inclui formas graves e mortais de hepatites tóxicas agudas que impõem o transplante hepático. A maioria dos estudos aponta no sentido de que os genótipos do *NAT2* correspondentes a acetiladores lentos aumentam a susceptibilidade para a ocorrência de hepatotoxicidade, mas com um efeito modesto.

A individualização da dosagem terapêutica de acordo com a capacidade metabólica do doente é actualmente possível a custos moderados, recorrendo à genotipagem dos doentes, embora a comprovação dos seus benefícios careça de estudos prospectivos.

Para avaliar as repercussões da individualização terapêutica da isoniazida com base na genotipagem, na população portuguesa, é essencial a caracterização das frequências dos vários genótipos do *NAT2*. Estudaram-se 101 doentes tratados nos Hospitais da Universidade de Coimbra e no Serviço de Luta Anti-tuberculose do Centro e uma população controlo de 60 indivíduos. A genotipagem do *NAT2* foi efectuada por sequenciação automática. As frequências de acetiladores rápidos, intermédios e lentos foram, respectivamente, de 3.96 %, 45.54% e 50,5% nos doentes com tuberculose, e de 8.33%, 41.67% e 50% na população controlo ($p>0.05$). Conclui-se que pelo menos metade dos doentes que acorrem aos cuidados de saúde são acetiladores lentos e deste modo, poderão beneficiar de uma dosagem terapêutica personalizada.

Palavras-chave:

Farmacogenética, Isoniazida, N-acetiltransferase 2 Humana (*NAT2*), Hepatotxicidade.

ABSTRACT

Pharmacogenomics, which currently includes the pharmacogenetics domain, represents a major advancement to the individualization of medicine, enabling the selection of the best drug and appropriate dose to the genotype of each individual, allowing an increase of the drug's efficacy while decreasing its toxicity.

The objectives of this review article consist, first, on a generic approach of the implications of *NAT2* genotyping on tuberculosis treatment with isoniazid and secondly, on the presentation of a study of the frequencies of the *NAT2* genotypes in a sample of population from the center of Portugal.

Tuberculosis remains a problem at a global scale, being the main cause of death by a curable infectious disease, justifying the need for continuous investigation and the implementation of measures to improve its treatment. In Portugal, despite a favorable evolution, the public health problem still remains, with consequences at human, economic and social levels.

The *NAT2* gene encodes the N-acetyltransferase 2 enzyme, which is responsible for isoniazid acetylation, an essential drug for the treatment of tuberculosis. Polymorphisms of the *NAT2* gene contribute to inter-individual variability of isoniazid acetylation, allowing the classification of individuals in rapid, intermediate and slow acetylators by genotyping and to adjust the therapeutic dose.

The serum concentrations of isoniazid influence the therapeutic efficacy, and mainly, its toxicity, which includes serious and even fatal forms of acute toxic hepatitis that may require hepatic transplantation. Most of the studies point towards *NAT2* genotypes corresponding to slow acetylator status, as being more susceptible to hepatotoxicity, but with a mild effect.

The dose individualization according to the metabolic capacity of the patient is currently possible with moderate costs through genotyping, however prospective studies are still needed to verify its benefits.

To evaluate the repercussions of therapy individualization with isoniazid by genotyping, in the Portuguese population, it is essential to know the frequencies of *NAT2* genotypes. We studied 101 patients treated in the *Hospitais da Universidade de Coimbra* and in the *Serviço de Luta Anti-tuberculose do Centro* along with a control population of 60 people. *NAT2* genotyping was performed by automatic sequencing. The frequencies of rapid, intermediate and slow acetylators were, respectively, 3.96%, 45.54% and 50.5% on the tuberculosis patients, and of 8.33%, 41.67% and 50% on the control population ($p>0.05$). We concluded that at least half of the patients who seek health care are slow acetylators and thus, may benefit of a personalized therapeutic dose.

Keywords:

Pharmacogenetic, Isoniazid, N-acetyltransferase 2 (NAT2), Hepatotoxicity.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1- Introdução.....	1
2- Materiais e métodos	4
3 - Tuberculose: o problema de saúde pública	6
3.1 – A situação mundial	7
3.2. A situação em Portugal	9
3.3. Esquemas terapêuticos e de prevenção	11
4- A Isoniazida (INH).....	13
4.1. Mecanismo de acção	14
4.2. Metabolismo da INH	16
4.3 - As enzimas NAT e o gene <i>NAT2</i>	18
4.4. Toxicidade	23
4.5- Correlação genótipo-fenótipo e individualização da terapêutica	25
5 - Genotipagem do <i>NAT2</i> numa amostra de população do centro de Portugal	30
5.1. Objectivo do estudo	31
5.2. Materiais e métodos	31
5.3. Resultados e discussão.....	34
6- Conclusões	38
Bibliografia.....	43

1- Introdução

1- Introdução

A farmacogenética dedica-se ao estudo das bases genéticas da variabilidade individual das respostas aos fármacos, explicada por polimorfismos das enzimas de metabolismo, dos transportadores e dos alvos terapêuticos. Trata-se de uma variabilidade originada por polimorfismos genéticos constitucionais, isto é, herdados. A farmacogenómica, termo mais actual da era da genómica, inclui a identificação de novos alvos terapêuticos e a caracterização das variantes genéticas somáticas (adquiridas), específicas das células patológicas, de modo a seleccionar uma terapêutica específica. Aplicada sobretudo à oncologia, recorre a metodologias de estudo global do genoma e à identificação de mutações somáticas tumorais. Actualmente, o termo farmacogenómica passou a englobar o domínio da farmacogenética.

A farmacogenómica trouxe um novo alento à medicina personalizada, com a possibilidade de seleccionar o fármaco e a dose adequadas ao genótipo de cada indivíduo, prometendo maior sucesso terapêutico e diminuição da toxicidade (Wang L, 2010).

Os estudos farmacogenéticos iniciais focaram-se nos fármacos com curvas de concentrações séricas bi ou trimodais, compatíveis com fenótipos monogénicos, isto é na dependência de um só gene, quase sempre codificador de uma enzima de metabolismo. Recentemente, cada vez se analisam mais vias metabólicas completas e fármacos/fenótipos poligénicos, tirando partido das novas tecnologias genómicas.

No entanto, a repercussão clínica da caracterização do genótipo constitucional na selecção da dose é praticamente nula, não obstante a comercialização de arrays como o “AmpliChip CYP450”, que permitem a identificação de alelos dos genes *CYP2D6* e *CYP2C19*, envolvidos na variabilidade da resposta a vários fármacos.

As dificuldades advêm de vários factores: muitos dos fármacos têm um metabolismo de características poligénicas; as variantes de risco frequentemente são raras; a adaptação da dose pode ser feita por avaliação de parâmetros clínicos (por exemplo frequência e ritmo cardíaco) e laboratoriais (por exemplo provas de coagulação); há fármacos alternativos; custos da genotipagem, e, sobretudo, não há estudos prospectivos que comprovem a utilidade da individualização da terapêutica com base na genotipagem do doente.

A isoniazida (INH), um fármaco essencial para o tratamento da tuberculose, constitui um exemplo “clássico” de um fármaco com um metabolismo de características monogénicas. As concentrações plasmáticas de INH cedo demonstraram uma distribuição bimodal após a administração de doses idênticas a diferentes indivíduos, explicada por variações genéticas na *N*-acetilação da INH, pela enzima *N*-acetiltransferase 2 (NAT2). Actualmente sabemos que a distribuição bimodal se deve a polimorfismos genéticos do gene *NAT2*.

Diferentes capacidades de acetilação, AR (acetiladores rápidos), AL (acetiladores lentos) e AI (acetiladores intermédios, originalmente classificados como AR), correspondem a diferentes genótipos. As variantes genéticas consideradas de risco para toxicidade são frequentes, atingindo os 50% entre caucasianos.

Estas características tornam a INH o exemplo de um fármaco para o qual a genotipagem poderá apresentar vantagens para a optimização e segurança terapêutica.

Este artigo de revisão pretende numa primeira instância abordar de uma forma genérica as implicações da genotipagem do *NAT2* na terapêutica da tuberculose com isoniazida. De seguida, descrever-se-ão os resultados de um estudo das frequências genóticas do *NAT2* efectuado numa amostra de população do centro de Portugal.

2- Materiais e métodos

2- Materiais e métodos

A **metodologia de consulta** baseou-se na pesquisa de artigos publicados em diversas revistas científicas referenciadas na Pubmed. Consultei também o NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Utilizei como palavras-chave: Pharmacogenetic, Isoniazid, Human N-acetyltransferase 2 (NAT2), Hepatotoxicity.

3 - Tuberculose: o problema de saúde pública

3- Tuberculose: o problema de saúde pública

3.1 – A situação mundial

A tuberculose (TB), sendo a principal causa de morte provocada por uma doença infecciosa curável, é um problema global, cuja dimensão, em números absolutos, continua a crescer, com um número estimado de 9 milhões de novos casos de doença e aproximadamente 2 milhões de mortes por ano (Hall et al., 2009).

A maior parte (cerca de 85%) dos casos ocorreu na Ásia (50%) e África (30%) (Fig. 1). As mais elevadas taxas de incidência *per capita* encontram-se nos países da África Subsaariana, chegando a atingir os 1000 casos por 100 mil habitantes. Em 2007, a União Europeia teve uma incidência média de 17/100000, com Portugal a registar um dos mais elevados índices, de 27/100000 (Duarte et al., 2010).

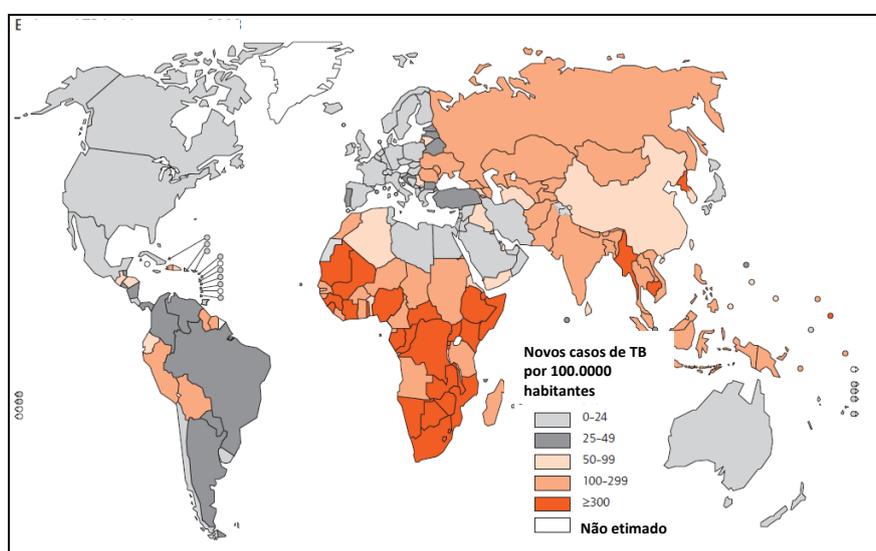


Fig. 1 – Taxas de incidência da tuberculose por país, 2008 (Adaptado de *Global Tuberculosis Control: a short update to the 2009 report*, OMS).

Contudo, nos últimos 15 anos conseguiram-se grandes progressos, com a implementação da estratégia DOTS (*Directly Observed Therapy Short-Course*), seguida

mais tarde pela Estratégia e o Plano Global “Stop” TB em 2006. A taxa de incidência *per capita* atingiu o seu valor máximo em 2004 ($143/10^5$), o que significa que o mundo está em vias de atingir uma das metas propostas para o milénio, “*Millennium Development Goals*”, que consiste em parar e inverter a incidência de malária e outras doenças como a tuberculose em 8 das 9 sub-regiões epidemiológicas da OMS (Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose, PNT, Março 2010)

A TB, como infecção oportunista, é a principal causa de morte dos doentes com SIDA. Dos 9.4 milhões de casos de TB em 2008, 1.4 milhões estavam co-infectados pelo VIH. Os cuidados acrescidos que estes doentes carecem não são na maioria dos casos prestados, pois o teste de VIH é efectuado a apenas a cerca de 22% dos casos de TB (PNT, Março 2010).

O impacto da implementação da estratégia DOTS está ameaçado pela emergência de formas de doença com multirresistência, um problema relacionado com a não adesão ao tratamento e/ou a uma incorrecta escolha do regime terapêutico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima a emergência global de cerca de meio milhão de novos casos de tuberculose multirresistente (TBMR) por ano, incluindo 50000 casos de tuberculose extensamente resistente a fármacos (TBXDR). Estes números são assustadores, sobretudo tendo em conta que apenas 7% destes receberão cuidados mínimos de diagnóstico e tratamento, vindo a morrer 150 mil pessoas por ano, principalmente na Índia e China (PNT, Março 2010).

Por tudo o que foi referido anteriormente, conclui-se que a TB constitui um problema de saúde com uma incidência e prevalência ainda bastante elevadas que justificam a necessidade contínua de investigação e a implementação de medidas que optimizem o seu tratamento.

3.2. A situação em Portugal

Em Portugal, assiste-se a uma diminuição acentuada do nível endémico da tuberculose, directamente associada à melhoria dos índices de desempenho do PNT, com uma evidente redução da prevalência da resistência aos antibióticos específicos.

Contudo, a situação é menos favorável nas grandes áreas urbanas de Lisboa, Porto e Setúbal, onde se concentra a maior parte dos casos registados no país e onde o ritmo de declínio é mais lento. Nestas áreas, incidem com particular intensidade os mais determinantes factores de risco, com conseqüente impacto negativo no sucesso terapêutico e no aumento da resistência aos fármacos.

Em relação à União Europeia, Portugal é um dos países com maior incidência de casos notificados e com maior expressão dos aspectos que lhe conferem o carácter de infecção emergente. Com 24 casos/100 mil habitantes em 2009, menos 8% do que em 2008, Portugal tem um decréscimo anual médio de 7.3%, consistente desde 2002 (Fig. 2), embora não ultrapassado a fasquia dos 20/100mil, que lhe conferiria a categoria de país de baixa incidência. Contudo, das 20 unidades de coordenação do PNT, entre distritos e regiões autónomas, 14 têm já menos de 20/100mil novos casos (Fig. 3).

A infecção por HIV, a toxicodependência, o alcoolismo, a reclusão, e a situação de sem abrigo são factores de risco para a doença. Contudo, em mais de 65 % dos casos de TB não há factores de risco identificados. Este facto traduz ainda a existência de elevado potencial de transmissão na comunidade.

A emergência de casos de TB multirresistente (TBMR) em Portugal apresenta uma incidência que está abaixo da mediana dos países da Europa Ocidental (1.7% dos casos de TB), mas tem particular expressão na região de Lisboa e Vale do Tejo. Entre os casos de TBMR, tem sido muito elevada a proporção de casos extensivamente resistente

(TBXDR), ou seja, as formas mais graves. Este facto teve um efeito cumulativo na prevalência de casos em tratamento por muitos anos, perpetuando-se as fontes de infecção. O carácter endémico que assim adquiriu motivou a declaração de área de alta prioridade no plano de acção, com a criação do Centro de Referência Nacional para a TBMR, levando, conseqüentemente à implementação de um novo paradigma na abordagem do problema.

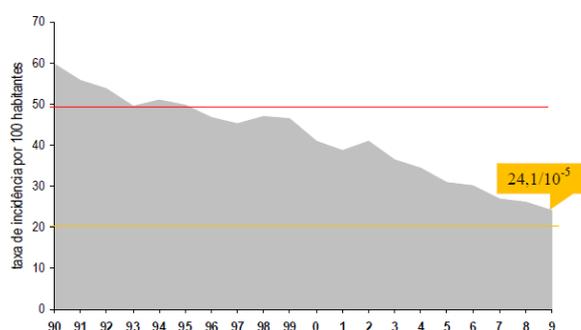


Fig. 2 – Taxa de Incidência: evolução em 20 anos (1980-2009). Verifica-se um decréscimo sustentado desde 2002, sendo o valor preliminar, em 2009, de 24 novos casos por 100 mil habitantes. Acima da linha considera-se alta incidência, abaixo da linha laranja situam-se os valores de baixa incidência (Adaptado de PNT, Março 2010).

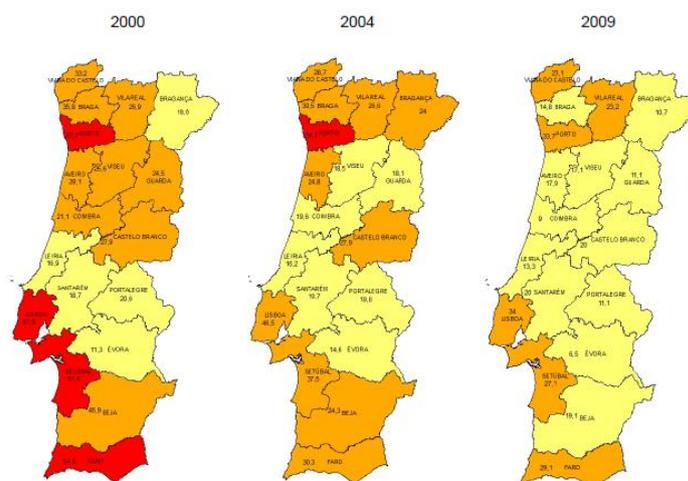


Fig. 3 – Incidência de casos novos de TB notificados por 100 mil habitantes: distribuição geográfica e evolução de 2000 a 2009. Distritos com alta incidência (> 50/100 mil) a encarnado; incidência intermédia (>20 e <50/100 mil) a laranja e distritos com baixa incidência (<20/100 mil) a amarelo. A Região Autónoma da Madeira teve <20/100 mil (amarelo) de 2000 a 2009. A Região Autónoma dos Açores teve >20/100 mil (laranja) em 2000 e 2004, e amarelo em 2009 (Adaptado de PNT, Março 2010).

Os dados revelam que embora a situação em Portugal esteja a ter uma evolução favorável, o problema de saúde pública persiste, com elevados custos humanos, económicos e sociais.

3.3. Esquemas terapêuticos e de prevenção

Os fármacos considerados de 1ª linha na quimioterapia antituberculosa são a INH, a rifampicina, a pirazinamida e o etambutol. Esses fármacos são bem-absorvidos após a administração oral, com níveis séricos máximos em 2 a 4h e eliminação quase completa em 24h, sendo recomendados com base na sua actividade bactericida precoce (capacidade de reduzir rapidamente o número de microrganismos viáveis e tornar os pacientes não infecciosos), na sua actividade de esterilização (capacidade de matar todos os bacilos e, portanto, esterilizar os tecidos acometidos, medida em termos de capacidade de evitar recidivas) e na sua capacidade de prevenção de resistência (Fauci et al., 2008).

Os esquemas-padrão de ciclo curto, com duração de 6 meses, são divididos numa fase inicial ou bactericida e numa fase de continuação ou de esterilização. Durante a fase inicial, a maioria dos bacilos da tuberculose é destruída, ocorre resolução dos sintomas, e o paciente torna-se habitualmente não infeccioso. A fase de continuação é necessária para eliminar as micobactérias persistentes e evitar a recidiva. O esquema terapêutico de escolha para praticamente todas as formas de tuberculose, tanto em adultos quanto em crianças, consiste numa fase inicial de 2 meses com INH, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguida de uma fase de continuação de 4 meses com INH e rifampicina. A administração pode ser diária (7 a 5 dias por semana), trissemanal ou bissemanal, e sempre que praticável seguindo a estratégia DOTS.

O recurso a esquemas terapêuticos com 4 fármacos diminui a probabilidade de resistências mas aumenta a incidência de toxicidade medicamentosa, nomeadamente a hepatotoxicidade, com efeitos potenciadores, sobretudo no caso da INH, rifampicina, e pirazinamida. Os esquemas de administração não diários podem levar a diminuição crítica das concentrações séricas, sobretudo no caso dos acetiladores rápidos, caso o doente falhe uma das tomas.

Na quimioprofilaxia primária dos contactos não infectados e na quimioprofilaxia secundária, dos indivíduos com tuberculose infecção, está indicada a administração de INH, em associação a outros antibacilares na segunda situação. As doses de INH são semelhantes às utilizadas nos esquemas terapêuticos, pelo que o risco de toxicidade se mantém.

4- A Isoniazida (INH)

4- A Isoniazida (INH)

4.1. Mecanismo de acção

Depois da rifampicina, a INH é considerada o melhor agente antituberculoso disponível, devendo ser incluída em todos os esquemas de tratamento da tuberculose, a não ser que o microrganismo seja resistente. A INH é barata, rapidamente sintetizada, disponível no mundo inteiro, altamente selectiva para as micobactérias e relativamente bem tolerada.

A INH é a hidrazida do ácido isonicotínico, uma pequena molécula hidrossolúvel que penetra facilmente na célula. É uma pró-droga, activada pela enzima catalase-peroxidase do *Mycobacterium tuberculosis*, KatG. A KatG favorece a complexação do ácido isonicotínico com NADH. Este complexo liga-se à *proteína reductase transportadora de enoil-acil*, InhA, e bloqueia a sintetase dos ácidos gordos, impedindo, assim, a síntese do ácido micólico, componente da parede celular da micobactéria

A INH actua como bactericida contra microrganismos em multiplicação rápida, tanto extracelulares como intracelulares, mas como bacteriostático contra bacíolos com uma divisão lenta.

Com uma potente acção bactericida precoce, a INH elimina a maior parte da população de *Mycobacterium tuberculosis* que representa bacilos na fase de crescimento exponencial (Gumbo et al., 2007). Contudo, a capacidade bactericida da INH cessa depois de 2 a 3 dias de terapêutica, com a diminuição da taxa de divisão bacilar. As concentrações inibitórias mínimas (MICs) e as concentrações bactericidas mínimas (MBCs) são extremamente baixas.

A dose diária de INH recomendada para o tratamento da tuberculose em adultos (esquema diário) é de 5 mg/kg, até um máximo de 300 mg (as doses para crianças são semelhantes, embora algumas autoridades recomendem doses mais altas, de 10 a 15 mg/kg/dia). Com estas dosagens a INH atinge facilmente concentrações terapêuticas no soro, líquido cefalo-raquídeo e caseum dos granulomas.

A MIC da INH (MIC90) para as estirpes do *Mycobacterium tuberculosis* tem sido descrita como estando no intervalo de 0.025 a 0.1 µg/ml. A actividade bactericida precoce (ABP) máxima foi alcançada com concentrações séricas de INH da ordem dos 2-3 µg/ml (Donald et al, 2007). Estudos anteriores sobre a relação entre a dose de INH e a ABP (Fig. 4) evidenciam que 600 mg de INH correspondiam à ABP média mais alta (0.539) e 18.75 mg de INH correspondiam à ABP mais baixa (0.111), mas ainda assim detectável (Donald et al., 1997). Ora a dose de 18,75 mg, é cerca de 16 vezes menor do que a dose terapêutica diária usual, de onde se infere que a dosagem habitual tem uma margem de segurança muito elevada.

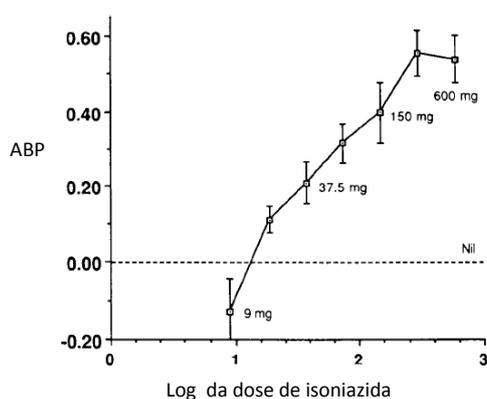


Fig. 4 – Relação entre a actividade bactericida precoce (ABP) e a dose (\log_{10} mg) de INH (Adaptado de Donald et al., 1997).

4.2. Metabolismo da INH

Após a administração oral, INH é absorvida de forma rápida e relativamente completa pelo tracto gastrointestinal. Após metabolização a nível hepático, os metabolitos são eliminados por via renal, não havendo necessidade de correcção de dose mesmo em insuficientes renais terminais.

No fígado, a INH é inicialmente metabolizada em acetilisoniazida via N-acetiltransferase-2 (NAT2), seguida pela hidrólise a acetilhidrazina. Acetilhidrazina é depois oxidada pelo citocromo P450 2E1 (codificado pelo gene *CYP2E1*) para formar hidroxilaminas, que são intermediários na formação de metabolitos hepatotóxicos (Fig. 5) (Lee et al., 2010).

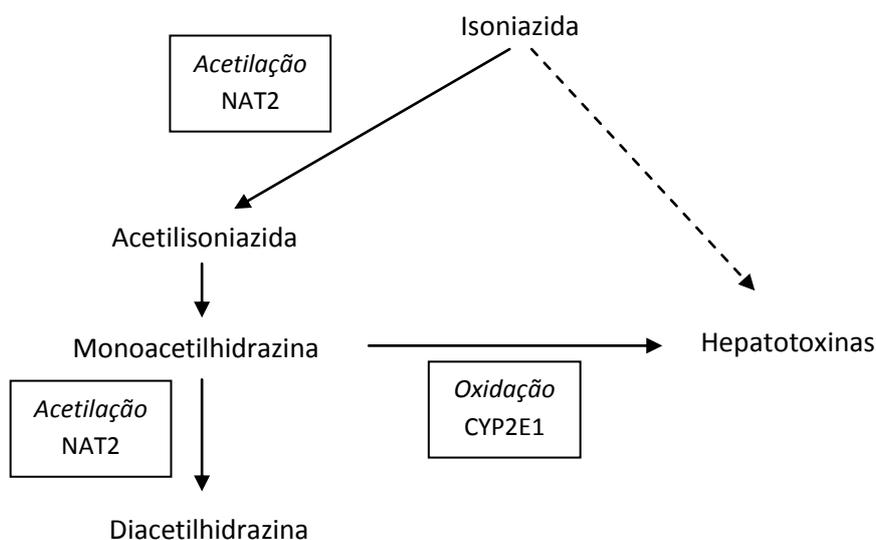


Fig. 5 – Vias de metabolização da INH. As principais (confirmadas) vias estão indicadas a traço contínuo, enquanto que uma hipotética via alternativa é indicada a tracejado. As 2 enzimas envolvidas nestas vias são a NAT2 e a CYP2E1 (Adaptado de Vuilleumier et al., 2006).

Como já anteriormente referido, a enzima NAT2, codificada pelo gene *NAT2*, é a principal responsável pelo metabolismo da INH, existindo uma correlação entre genótipos e fenótipos de acetilação. Esta correlação tem consequências sobretudo a

nível da toxicidade medicamentosa, mais do que a nível da eficácia terapêutica. De facto, em situações de baixa actividade da NAT2, há aumento das concentrações séricas de INH e desvio do metabolismo para vias alternativas responsáveis pela acumulação de metabolitos tóxicos (Dupret J, Rodrigues-Lima F, 2005).

As curvas de concentrações séricas da INH são bi/trimodais, correspondendo a uma situação monogénica, compatível com um metabolismo essencialmente dependente de uma única enzima, polimórfica (Fig. 6).

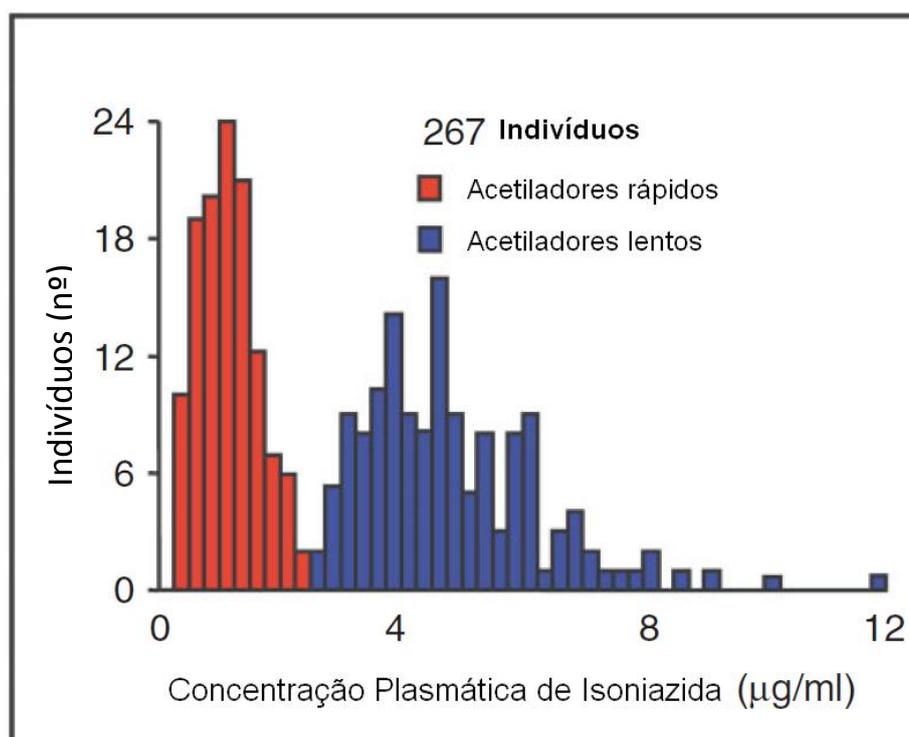


Fig. 6 – Curva sérica bimodal após administração de INH (adaptado de Wang L., 2010).

Não parecem existir interferências com outros fármacos com capacidade indutora/inibidora enzimática, nomeadamente com a rifampicina nem com os retrovirais usados nos doentes com SIDA (Conte et al., 2002).

Estudos de farmacocinética com INH demonstraram que os anti-ácidos não alteram a C_{max} , T_{max} e $AUC_{0-\infty}$, mas em contraste, a comida rica em lípidos, recomendada pelo *Food and Drug Administration*, reduziu a C_{max} , quase duplicou a

T_{\max} e reduziu a $AUC_{0-\infty}$. Estas alterações podem ser evitadas administrando INH em jejum (Peloquin et al., 1999).

4.3 - As enzimas NAT e o gene NAT2

A biotransformação dos fármacos envolve a acção concertada de grupos específicos de enzimas que convertem quimicamente os fármacos, que são normalmente lipofílicos, para metabolitos hidrofílicos mais facilmente excretados. As mesmas enzimas estão envolvidas na modificação de tóxicos ambientais. Esta biotransformação tanto pode inactivar como activar os fármacos e tóxicos. No metabolismo de **fase I**, há introdução ou exposição de grupos polares, por reacções como a oxidação, redução ou hidrólise, convertendo os fármacos em metabolitos mais hidrofílicos, que podem ser menos activos ou mais activos, no caso de pró-drogas. As reacções de tipo I são mediadas principalmente pelos citocromos P450 (CYPs) e, em menor medida, pelas mono-oxigenases contendo flavinas (FMOs). No metabolismo de **fase II**, o produto da biotransformação de fase I é conjugado, por exemplo com ácido glucurónico, com sulfonatos, ou com glutathione, tornando-se quase sempre inactivo. 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).

As Arilamina *N*-acetiltransferases (NATs) são enzimas de fase II e catalisam a *N*-acetilação de arilaminas e aminas heterocíclicas com o grupo acetil, transferido da acetilCoenzima A. Têm sido associadas desde há muito com o metabolismo de vários fármacos e com a carcinogénese.

A enzima NAT2, da família das arilaminas N-acetiltransferases, foi dos primeiros exemplos de enzimas associadas à variação de respostas a fármacos, tendo sido identificada como a responsável pela inactivação e variabilidade de resposta à INH. Estudos farmacocinéticos em indivíduos e *in vitro* com extractos hepáticos (McQueen et al., 1982) estabeleceram que a actividade de N-acetilação da INH era polimórfica, podendo dividir-se a população em acetiladores lentos e acetiladores rápidos. Posteriormente, reconheceu-se que as diferentes actividades enzimáticas estavam dependentes de polimorfismos do gene que codifica a enzima, o gene *NAT2*.

O gene *NAT2*, um gene homólogo, o *NAT1* e um pseudogene, o *NATP*, localizam-se no cromossoma humano 8p21.3. O gene *NAT2* (OMIM nº 612182; nº de acesso ao GeneBank NT_030737) é um gene sem intrões, com 870 pb e com uma região reguladora que inclui sequências de ligação para vários factores de transcrição entre os quais se destacam a P53 e os PPAR γ 1 e 2.

Os genes *NAT2* e *NAT1*, apresentam 87% de homologia, são ambos polimórficos, mas codificam enzimas com selectividade para diferentes substratos: a *NAT2* com especificidade para a sulfadimidina e procainamida e a *NAT1* com especificidade para o ácido para amino salicílico (PAS) e ácido para amino benzóico (PABA). A isoenzima *NAT2*, expressa predominantemente no fígado e intestino, é ainda responsável pela acetilação de outros fármacos, tais como nitrazepam, clonazepam, amrinona, hidralazina e dapsona, para além da INH, embora só para alguns destes fármacos a acetilação seja polimórfica.

Actualmente estão descritos vários polimorfismos de tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) no gene *NAT2* que permitem identificar 62 alelos ou haplótipos, compostos pela combinação destes SNPS (Tabela 1). A nomenclatura dos polimorfismos do gene *NAT2* pode ser encontrada no website oficial:

<http://louisville.edu/medschool/pharmacologyconsensus-human-arylamine-n-acetyltransferase-gene-nomenclature/>. Os alelos *NAT2*4*, *NAT2*13*, *NAT2*12* e *NAT2*18*, associam-se a uma elevada capacidade de acetilação, e quando o genótipo inclui dois destes alelos, o indivíduo comporta-se como acetilador rápido (AR). Os restantes alelos têm sido associados a uma baixa actividade enzimática e quando estão presentes dois desses alelos, o indivíduo tem o fenótipo de acetilador lento (AL). Um genótipo composto por um alelo “rápido” e um “lento” associa-se a um grau intermédio (AI) de actividade enzimática, embora, para estes genótipos, haja maior variabilidade fenotípica e classicamente fossem considerados no grupo dos acetiladores rápidos. A diminuição da actividade enzimática aumenta a susceptibilidade para efeitos tóxicos a fármacos, podendo ocorrer, por exemplo, lúpus eritematoso em doentes que receberam hidralazina ou procainamida, anemia hemolítica e doença inflamatória intestinal depois do tratamento com sulfasalazina (Crettol et al., 2010), e claro, hepatotoxicidade no caso da INH.

Os polimorfismos do gene *NAT2* associados a diminuição da capacidade enzimática (bases 191, 341, 434, 590 e 857 da região codificante), são de tipo *missense*, isto é levam à substituição de um aminoácido por outro. Não está bem esclarecida a razão da perda da actividade de acetilação, que tem sido atribuída, quer à alteração da estrutura terciária da enzima, com redução da sua estabilidade, afinidade para o substrato e também da actividade catalítica, quer a uma menor estabilidade do RNA e consequente redução nos níveis de produção da enzima (Walraven et al., 2008).

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 acetiladores lentos (Tabela 2). Estas

diferenças têm repercussões nas diferentes taxas de reacções adversas a fármacos, de acordo com a ascendência dos doentes (Goldenkova-Pavlova et al., 2006).

Os diferentes fenótipos de acetilação, correspondendo a diferentes perfis genéticos individuais do gene *NAT2*, têm consequências para a terapêutica de uma infecção crónica grave, que persiste como problema de dimensão mundial, a tuberculose.

Tabela 1 – Alelos *NAT2* (adaptado de Walraven et al., 2008)

Alelo <i>NAT2</i> (Haplótipo)	Alteração(ões) do(s) Nucleótido(s) e Identificadores rs	Alteração(ões) do(s) Aminoácido(s)	Fenótipo
<i>NAT2*4</i>	Referência	Referência	Rápido
<i>NAT2*5A</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929)	<i>I114T</i> <i>L161L</i> (sinónimo)	Lento
<i>NAT2*5B</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208)	<i>I114T</i> <i>L161L</i> (sinónimo) <i>K268R</i>	Lento
<i>NAT2*5C</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>A803G</i> (rs1208)	<i>I114T</i> <i>K268R</i>	Lento
<i>NAT2*5D</i>	<i>T341C</i> (rs1801280)	<i>I114T</i>	Lento
<i>NAT2*5E</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>G590A</i> (rs1799930)	<i>I114T</i> <i>R197Q</i>	Lento
<i>NAT2*5F</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>C759T</i> <i>A803G</i> (rs1208)	<i>I114T</i> <i>L161L</i> (sinónimo) <i>K268R</i> <i>V253V</i> (sinónimo)	Lento
<i>NAT2*5G</i>	<i>C282T</i> (rs1041983) <i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208)	<i>Y94Y</i> (sinónimo) <i>I114T</i> <i>L161L</i> (sinónimo) <i>K268R</i>	Lento
<i>NAT2*5H</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208) <i>859Del</i>	<i>I114T</i> <i>L161L</i> (sinónimo) <i>K268R</i> <i>S287 Frameshift</i>	Lento
<i>NAT2*5I</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>A411T</i> (rs4986997) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208)	<i>I114T</i> <i>L137F</i> <i>L161L</i> (sinónimo) <i>K268R</i>	Lento
<i>NAT2*5J</i>	<i>C282T</i> (rs1041983) <i>T341C</i> (rs1801280) <i>G590A</i> (rs1799930)	<i>Y94Y</i> (sinónimo) <i>I114T</i> <i>R197Q</i>	Lento
<i>NAT2*5K</i>	<i>C282T</i> (rs1041983) <i>T341C</i> (rs1801280)	<i>Y94Y</i> (sinónimo)	
<i>NAT2*5L</i>	<i>T70A</i> <i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208)	<i>L24I</i> <i>I114T</i> <i>L161L</i> (sinónimo) <i>K268R</i>	
<i>NAT2*5M</i>	<i>T341C</i> (rs1801280) <i>C481T</i> (rs1799929) <i>A803G</i> (rs1208) <i>G838A</i>	<i>I114T</i> <i>L161L</i> (sinónimo) <i>K268R</i> <i>V289M</i>	
<i>NAT2*6A</i>	<i>C282T</i> (rs1041983) <i>G590A</i> (rs1799930)	<i>Y94Y</i> (sinónimo) <i>R197Q</i>	Lento
<i>NAT2*6B</i>	<i>G590A</i> (rs1799930)	<i>R197Q</i>	Lento
<i>NAT2*6C</i>	<i>C282T</i> (rs1041983) <i>G590A</i> (rs1799930) <i>A803G</i> (rs1208)	<i>Y94Y</i> (sinónimo) <i>R197Q</i> <i>K268R</i>	Lento
<i>NAT2*6D</i>	<i>T111C</i> <i>C282T</i> (rs1041983) <i>G590A</i> (rs1799930)	<i>F37F</i> (sinónimo) <i>Y94Y</i> (sinónimo) <i>R197Q</i>	Lento
<i>NAT2*6E</i>	<i>C481T</i> (rs1799929) <i>G590A</i> (rs1799930)	<i>L161L</i> (sinónimo) <i>R197Q</i>	Lento
<i>NAT2*6F</i>	<i>G590A</i> (rs1799930) <i>A803G</i> (rs1208)	<i>R197Q</i> <i>K268R</i>	

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

Tabela 2 - Frequências dos **fenótipos** de acetilação em diferentes populações.

Fonte	População	AR	AI	AL
Cascorbi et al., 1995	Alemanha N= 844	41.1%*	-	58.9%
Ohno et al., 2000	Japão N= 77	36.4%	54.5%	9.1%
Donald et al., 2004	África do Sul N= 87	32.2%	41.4%	26.4%
Goldenkova-Pavlova et al., 2006	Moscovo N= 168	55%*	-	44%
Cho et al., 2007	Coreia N= 132	85.6%*	-	14.4%
Singh et al., 2009	Índia N= 201	55%	32%	13%
Lee et al., 2010	Taiwan N= 140	70.7%*	-	29.3%

AR: acetiladores rápidos; AI: acetiladores intermédios; AL: acetiladores lentos; * Os valores incluem os AI

4.4. Toxicidade

Todos os antibacilares têm efeitos adversos. Devemos conhecê-los bem, de modo a identificá-los e a agir prontamente. Os efeitos adversos principais da INH são: neuropatia periférica, *rash* cutâneo tipo lúpico, hepatite, sonolência e letargia. Os efeitos adversos raros, incluem convulsões, psicose, artralgia e anemia (Duarte et al., 2010). A administração da INH pode mesmo resultar em hepatotoxicidade aguda letal (Millard et al., 1996).

A neuropatia periférica é um evento adverso dose-dependente que ocorre em menos de 0,2% dos doentes com a terapêutica INH. A administração concomitante de 10 a 25 mg/dia de piridoxina previne esta complicação que parece ser mais frequente nos acetiladores lentos (AL).

A hepatotoxicidade é a complicação mais grave, podendo surgir em 1-36% dos doentes (Huang et al, 2002; Agal et al., 2005; Cho et al., 2007; Yamada et al., 2009). É definida como um aumento das transaminases (AST ou ALT) superior a 3 vezes o limite superior da normalidade se acompanhado de sintomas de hepatite, ou 5 vezes o limite superior do normal na ausência de sintomas. Podem também ocorrer aumentos da bilirrubina e da fosfatase alcalina, mais sugestivos de toxicidade à rifampicina. São factores de risco de hepatotoxicidade, a idade, doença hepática pré-existente, elevado consumo de álcool e um fenótipo de AL (Kinzig-Schippers et al., 2005). O risco de hepatites fulminantes, exigindo transplante hepático, tem sido descrito em 29.1% dos doentes sem monitorização clínica nem das provas funcionais hepáticas (Agal et al., 2005). Cerca de 10-20% dos indivíduos sob protocolos padrão e os com administração isolada de INH, em esquemas terapêuticos profiláticos, poderão apresentar elevação assintomática e transitória das transaminases (Hall et al., 2009). Nos últimos 10 anos ocorreram 4 casos de hepatite fulminante com necessidade de transplante hepático sob terapêutica com INH nos HUC. Um destes casos afectou uma jovem sob terapêutica profiláctica.

As situações de hepatotoxicidade exigem monitorização clínica e laboratorial, e a suspensão temporária dos fármacos hepatotóxicos. Ficam assim comprometidos a saúde, e por vezes mesmo a vida do doente, assim como o sucesso terapêutico da tuberculose. As consequências estendem-se à saúde pública e têm encargos económicos adicionais consideráveis, devido ao aumento do número de consultas médicas, de exames complementares e, em casos mais graves, de hospitalizações, podendo mesmo ser necessário o transplante hepático (Yee et al., 2003).

A possibilidade de prever a capacidade de metabolização e, conseqüentemente, da toxicidade da INH, pela genotipagem do doente, pode abrir caminho a uma terapêutica não só eficaz, como mais segura.

A INH é um inibidor potente de várias enzimas do citocromo P450, interferindo com as concentrações séricas de vários fármacos, mas não com as de outros antibacilares. No entanto, o risco de hepatotoxicidade aumenta ligeiramente na administração conjunta com a rifampicina (Ohno et al., 2000).

4.5- Correlação genótipo-fenótipo e individualização da terapêutica

Parece ser do consenso geral que há uma correlação entre os genótipos do *NAT2*, o fenótipo de acetilação e as concentrações séricas de INH (Donald et al. 2007; Kinzig-Schippers et al., 2005; Kubota et al. 2007). De facto, o genótipo do *NAT2*, isoladamente, parece explicar cerca de 88% da variabilidade da clearance da INH (Kinzig-Schippers et al., 2005).

A individualização da dose de acordo com o fenótipo de AR, AL e AI, pode ter implicações no sucesso terapêutico e na redução da toxicidade.

De acordo com Donald e colaboradores (2007), uma dose de INH de 3 mg/kg seria suficiente para alcançar os objectivos terapêuticos desejados no tratamento da tuberculose nos AL, mas os AR necessitariam de uma dose de 6 mg/kg para assegurar uma actividade bactericida óptima. Kinzig-Schippers e colaboradores (2005) sugeriram que a dose standard de INH pudesse ser ajustada a 2.5, 5.0 e 7.5 mg/kg para os AL, AI e AR, respectivamente, para alcançar níveis séricos semelhantes. Num outro estudo, propõe que a dose apropriada para os AR é 1.5 vezes superior (450 mg/dia) à

recomendada actualmente, e que metade da dose convencional seria apropriada para os doentes AL (Kubota et al., 2007).

Tem sido igualmente discutida a eficácia terapêutica dos esquemas com administração não diária, sobretudo em toma semanal única, em AR não cumpridores. A redução das concentrações séricas, acentuada pelo fenótipo AR, aumentaria a possibilidade de resistências e recaídas (Weiner et al. 2003).

No grupo de menores de 15 anos, para o qual não há unanimidade na dosagem recomendada, a caracterização do estado de acetilação poderia trazer maior rigor e segurança à terapêutica (Cranswick N, Mulholland K, 2005).

As diferenças nas dosagens propostas e as conhecidas variações das frequências genóticas/fenotípicas nas diversas etnias, reforçam a necessidade de reavaliação das dosagens standard recomendadas, em diferentes populações (Gumbo et al., 2007).

Embora com menor grau de evidência, a maior parte dos estudos existentes indicam que não só as concentrações de INH, mas também a toxicidade, estão relacionadas com a actividade da enzima NAT2 e com os respectivos perfis genotípicos. Assim, enquanto que os AR estariam mais expostos a falência terapêutica, os AL teriam um risco superior de efeitos adversos (ver fig. 7) (Hiratsuka et al., 2002).



Fig. 7 - Correlação entre fenótipo e complicações da terapêutica da tuberculose com INH.

É hoje em dia aceite que os AL estão mais sujeitos a desenvolver polineuropatia durante a terapêutica de INH, se não for co-administrada a piridoxina. Mas o efeito adverso mais relevante da INH é a hepatotoxicidade. A associação entre genótipos do *NAT2* correspondentes a AL e susceptibilidade para hepatotoxicidade induzida pela INH foi verificada em diferentes populações (Tabela 3). No entanto, nem todos os autores confirmam esta correlação (Vuilleumier et al., 2006; Yamada et al., 2009).

Tabela 3 – Exemplos de estudos em que se correlaciona o fenótipo de acetilação, obtido a partir de genotipagem do *NAT2*, com a ocorrência de hepatotoxicidade.

Referência	População	Com Hepatotoxicidade	Sem Hepatotoxicidade	OR (IC 95%)
Ohno et al., 2000	Japão N = 77	3.5% dos AR	96.5% dos AR	1 (referência)
		14.3% dos AI	85.7% dos AI	4.0 (1.94-6.06)
		100% dos AL	0% dos AL	28.0 (26-30)
Cho et al., 2007	Coreia N = 132	9.7% dos AR ou AI	90.3% dos AR ou AI	0.18 (0.06-0.57)
		36.8% dos AL	63.2% dos AL	5.41 (1.76-16.59)
Lee et al., 2010	Taiwan N = 140	24.2% dos AR	75.8% dos AR	1 (referência)
		51.2% dos AL	48.8% dos AL	3.28 (1.53-7.06)

OR: odds ratios; IC: intervalos de confiança

Na tentativa de identificar o genótipo de risco para a hepatotoxicidade à INH, têm sido estudados outros genes polimórficos codificadores de enzimas de metabolismo, como o *CYP2E1* e o *GSTM1*, *GSTT1*, *MnSOD* e *NQO1*.

Vuilleumier e colaboradores (2006) verificaram que o risco de elevação das enzimas hepáticas induzida pela INH era significativamente associado ao genótipo *CYP2E1*1A/*1A*. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de metabolismo da INH retratada na figura 5 que dá ênfase ao papel do *CYP2E1* na geração de produtos hepatotóxicos. No entanto, outros autores não confirmaram esta associação (Cho et al. 2007).

Num estudo recente concluiu-se que os genótipos *NAT2* correspondentes a AL são um factor de risco significativo para a hepatotoxicidade (OR = 3.28; IC 95% 1.53-

7.06; $p = 0.0019$) e que os polimorfismos do *CYP2E1* estão associado à sua gravidade (Lee et al., 2010).

A presença de homozigotia para polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* constituídos por alelos “nulos”, com deleção dos genes, têm igualmente sido associados à toxicidade hepática induzida pela INH, mas também com resultados contraditórios (Huang et al., 2007; Leiro et al., 2008).

Num estudo de polimorfismos dos genes de 4 enzimas, a manganésio superóxido dismutase (MsSOD), a NAD(P)H:quinona oxidoreductase (NQO1) e as glutathione S-transferase (GST) M1 e T1, concluiu-se que o alelo C do gene *MnSOD* poderia aumentar a susceptibilidade a doença hepática induzida por fármacos, e que o genótipo *GSTM1* “nulo” poderia estar relacionado com hepatotoxicidade dos fármacos antituberculosos (Huang et al, 2007).

Numa meta-análise, Sun e colaboradores (2008) verificaram que as OR médias para a correlação entre hepatotoxicidade aos fármacos antituberculosos e genótipos do *NAT2* correspondentes a AL, homozigotos *CYP2E1*1*, homozigotos *GSTM1*0* (nulos) e homozigotos *GSTT1*0* (nulos) era, respectivamente, de 1.93 (IC 95% = 0.81-4.62); 2.22 (IC 95% = 1.06-4.66); 2.62 (IC 95% = 1.45-4.75) e 1.18 (IC 95% = 0.61-2.29). Os autores concluíam que os genes *NAT2*, *CYP2E1* e *GSTM1* têm uma contribuição modesta, e que o *GSTT1* não contribui para a hepatotoxicidade.

Estudos recentes tentaram evidenciar o papel dos genes *HLA* na susceptibilidade à hepatotoxicidade devida a INH e outros fármacos usados no tratamento da TB, que se mostrou limitado (Sharma et al, 2002). Verificou-se, porém, forte relação dos genes *HLA* com outros fármacos, por exemplo flucloxacilina (Daly AK, 2010).

A genotipagem do *NAT2* é hoje uma metodologia ao alcance de muitos laboratórios, relativamente pouco onerosa e de cómoda realização, visto que apenas é

necessária uma colheita de sangue e não é influenciável por factores ocasionais como alterações transitórias da absorção. Tem ainda a vantagem de que a partir da mesma amostra de DNA se podem determinar génotipos que influenciem o metabolismo de outros fármacos. A tipagem fenotípica por estudos farmacocinéticos é mais onerosa e exige, para máxima eficiência, a colheita de amostras de sangue ao longo de várias horas. No entanto, permite uma avaliação global, que pode ser útil para os fármacos com uma farmacocinética com características poligénicas, ou para os quais a função renal é determinante. Apresenta uma vantagem inegável na situação de novos alelos, para os quais não esteja determinada a correlação com a actividade de acetilação.

A discordância dos resultados no que toca à correlação entre fenótipo de acetilação e hepatotoxicidade e a dificuldade de acesso à genotipagem têm sido os principais entraves à implementação clínica da genotipagem para individualização da terapêutica da tuberculose.

A facilidade com que hoje é realizada a técnica de sequenciação e a permanência da tuberculose como um problema grave da sua pública, justificam a realização de estudos prospectivos que avaliem se a individualização da terapêutica com base na genotipagem do *NAT2*, reduz a taxa de efeitos secundários da INH. Qualquer investimento será pouco significativo se tivermos em conta o custo económico do transplante hepático, que segundo o Diário da República 1ª série – N°147 – 31 de Julho de 2009, Portaria N°839-A/2009, é de 103103.21€, e o custo humano de perda de vidas.

**5 - Genotipagem do *NAT2* numa amostra de população
do centro de Portugal**

5- Genotipagem do NAT2 numa amostra de população do centro de Portugal

5.1. Objectivo do estudo

O objectivo deste trabalho foi estudar as frequências dos vários genótipos do *NAT2* em doentes tratados por tuberculose pulmonar na população portuguesa actual, para avaliar a repercussão da genotipagem na individualização da terapêutica da tuberculose. Este trabalho está integrado num projecto de doutoramento da Dr^a Celeste Alcobia, que envolve o Departamento de Terapêutica (Prof. Doutor Carlos Fontes Ribeiro; FMUC), a Pneumologia dos HUC (Prof. Doutor Carlos Robalo Cordeiro; FMUC) e o Departamento de Genética (Prof. Doutora Henriqueta C Silva; FMUC). Foi apresentado em forma de poster no Congresso de Pneumologia do Centro em 2010 (Namora et al., 2010).

O projecto foi aprovado pela Comissão de Ética dos HUC. Todos os doentes e controlos assinaram uma Declaração de Consentimento Informado.

5.2. Materiais e métodos

Populações:

Estudaram-se 101 doentes com diagnóstico de tuberculose pulmonar, sem infecção por HIV, tratados nos HUC e no SLAT do Centro nos últimos 5 anos e uma população controlo de 60 indivíduos. Eram todos caucasianos.

Genotipagem:

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

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. Utilizou-se o aparelho de espectrofotometria nanodrop (Nanodrop ND-1000).

Para a sequenciação estudaram-se 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 23 alelos (figura 8).

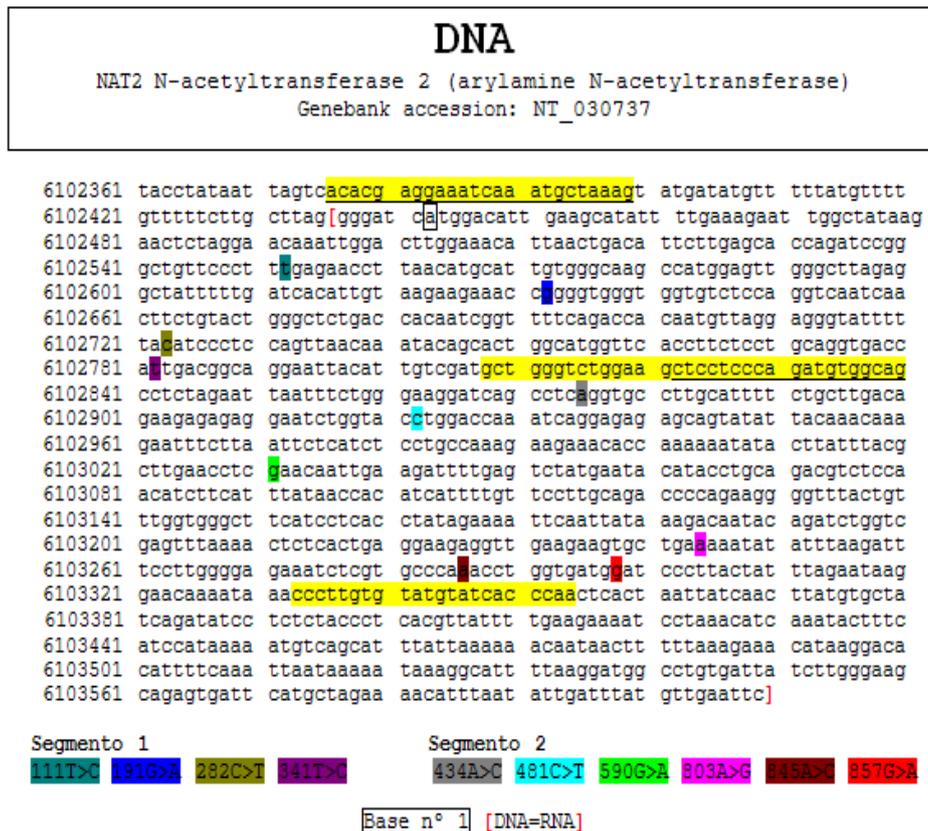


Fig. 8 - Sequência do NAT2: localização dos primers (a amarelo) e dos polimorfismos estudados.

Os primers estão descritos na tabela 4. Para cada amplificação, num volume final de 25µl, usaram-se cerca de 200ng de DNA, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0.25 µM de primers, tampão 1x e 1 unidade de Taq DNA polimerase. 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 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 cyclor*” da Biorad.

Tabela 4 - Primers utilizados para a PCR inicial e para a PCR de sequenciação

Gene <i>NAT2</i>	Pb	Primers
1º Segmento	465	Proximal: 5’acacgaggaaatcaaagctaaag 3’ Distal: 5’ctgccacatctgggaggag 3’
2º Segmento	547	Proximal: 5’gctgggtctggaagctctc 3’ Distal : 5’tgggtgatacacacaagg 3’

PCR: Reacção de polimerização em cadeia

Após verificação da qualidade da amplificação por electroforese dos produtos de PCR em agarose a 2%, procedeu-se a 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 Ilustra™*. Para cada PCR de sequenciação (duas para cada *amplicom*) utilizaram-se 14µL de H₂O, 2µL de tampão (*Applied Biosystem*), 2 µL de terminadores (*BD v1.1 Applied Biosystem*), 1µL de produto de PCR e 1µL de cada primer de sequenciação (os mesmos das PCRs iniciais). A análise de resultados foi efectuada com o programa *Sequencing Analysis Software v5.2* (Figura 9).

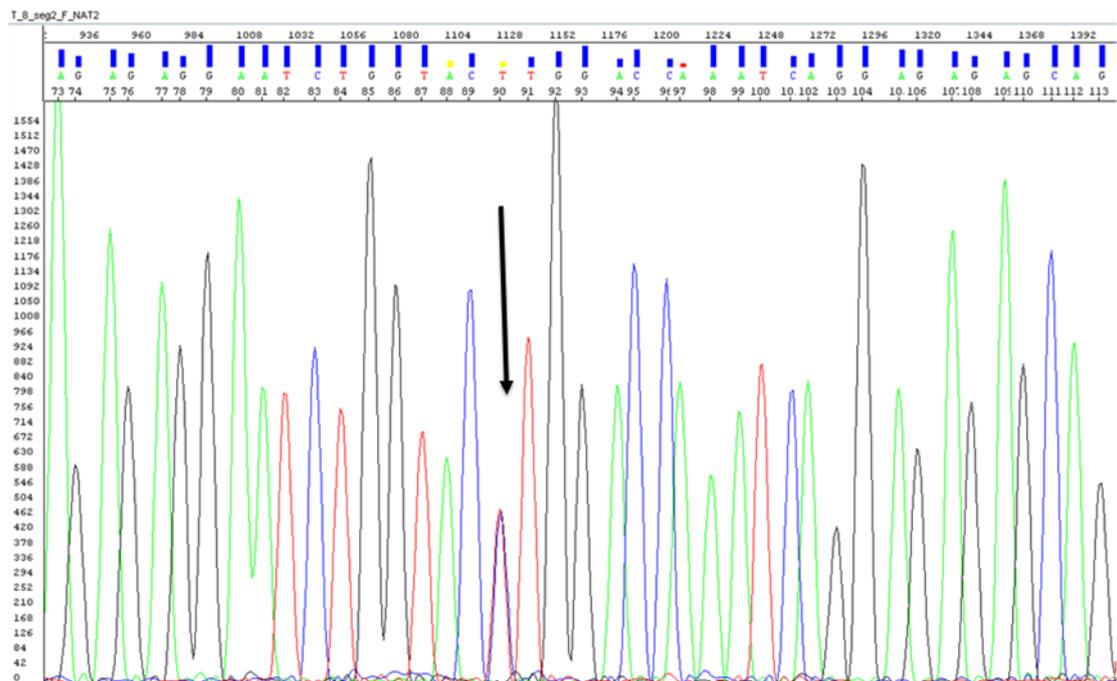


Fig. 9 – Electroferograma de sequenciação, sendo visível um polimorfismo em heterozigotia (481C>T). A sucessão de picos, lida da esquerda para a direita, corresponde à ordem das bases nucleotídicas. Cada cor corresponde a uma das bases.

Análise estatística:

A análise estatística foi efectuada aplicando o teste do qui-quadrado. Um valor P inferior a 0.05 foi considerado significativo.

Verificou-se que ambas as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.3. Resultados e discussão

As características das duas populações estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Características dos doentes e controlos		
Características	Doentes, n (%)	Controlo, n (%)
Mulheres	30 (29.7)	42 (70)
Homens	71 (70.3)	18 (30)
Idade (média; sd)	45.94; 17.36	37.88; 13.62

As frequências de AR, AI e AL foram, respectivamente, de 3.96%, 45.54% e 50.5% nos doentes com tuberculose, e de 8.33%, 41.67% e 50% na população controlo ($p>0.05$) (ver tabela 6).

Tabela 6 - Frequências dos fenótipos de acetilação obtidas por genotipagem do *NAT2*

Genótipo	Fenótipo	Controlos N (%)	Doentes N (%)	P	
<i>NAT2</i> *4/*4	AR	4 (6.67)	3 (2.97)	NS	
<i>NAT2</i> *12A/*12A		0 (0)	1 (0.99)	NS	
<i>NAT2</i> *12C/*12C		1 (1.67)	0 (0)	NS	
Total		5 (8.33)	4 (3.96)	NS	
<i>NAT2</i> *4/*5 ^a	AI	0 (0)	2 (1.98)	NS	
<i>NAT2</i> *4/*5B - <i>NAT2</i> *5A/*12A ¹		15 (25)	25 (24.75)	NS	
<i>NAT2</i> *4/*5C		1 (1.67)	1 (0.99)	NS	
<i>NAT2</i> *4/*6A - <i>NAT2</i> *6B/*13 ¹		6 (10)	15 (14.85)	NS	
<i>NAT2</i> *4/*6C		0 (0)	1 (0.99)	NS	
<i>NAT2</i> *4/*6C - <i>NAT2</i> *6A/*12A- <i>NAT2</i> *6B/*12B ¹		0 (0)	2 (1.98)	NS	
<i>NAT2</i> *4/*7B - <i>NAT2</i> *7A/*13 ¹		1 (1.67)	0 (0)	NS	
<i>NAT2</i> *5B/*12A - <i>NAT2</i> *5C/*12C ¹		1 (1.67)	0 (0)	NS	
<i>NAT2</i> *6A/13		1 (1.67)	0 (0)	NS	
Total		25 (41.67)	46 (45.54)	NS	
<i>NAT2</i> *5A/*5B		AL	0 (0)	1 (0.99)	NS
<i>NAT2</i> *5A/*6C			0 (0)	3 (2.97)	NS
<i>NAT2</i> *5A/*6C - <i>NAT2</i> *5B/*6A ¹			12 (20)	20 (19.8)	NS
<i>NAT2</i> *5B/*5B	10 (16.67)		11 (10.89)	NS	
<i>NAT2</i> *5B/*5C	0 (0)		2 (1.98)	NS	
<i>NAT2</i> *5B/*7B	2 (3.33)		1 (0.99)	NS	
<i>NAT2</i> *5C/*6A	0 (0)		1 (0.99)	NS	
<i>NAT2</i> *6A/*6A	5 (8.33)		7 (6.93)	NS	
<i>NAT2</i> *6A/*7B	1 (1.67)		5 (4.95)	NS	
Total	30 (50)		51 (50.5)	NS	
Totais		60	101	NS	

NS, não significante.

Ambas as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

¹A combinação de alelos não permite distinguir alguns genótipos, mas não há ambiguidade na classificação entre AI e AL.

Os genótipos de AR encontrados foram o *NAT2*4/*4*, *NAT2*12A/*12A* e *NAT2*12C/*12C*. Não houve diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos entre as duas populações.

Nos AI e AL a combinação de alelos não permite distinguir alguns genótipos, mas não há ambiguidade na classificação entre AI e AL.

Os vários estudos descritos na literatura recorrem a diferentes metodologias de genotipagem, tais como: técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real (Lee et al., 2010), PCR-RFLP (Singh et al., 2009; Ohno et al., 2000; Cascorbi et al., 1995) e PCR com sequenciação directa (Cho et al., 2007), entre outros. A importância da selecção da técnica reside no facto dos resultados poderem variar, dado que a sequenciação é a única técnica que permite a identificação de todos os genótipos.

No entanto, globalmente, as frequências genotípicas e fenotípicas por nós encontradas foram semelhantes às anteriormente descritas para populações caucasianas (Cascorbi et al., 1995; Lemos et al., 1998; Lemos et al., 1999; ...). Pelo facto de termos utilizado a metodologia de sequenciação, encontramos alguns alelos ainda não descritos para a população portuguesa, como o *NAT2*12A* e *NAT2*12C*.

São poucos os estudos realizados na população portuguesa e os poucos existentes recorreram à técnica de RFLPs. 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. As frequências alélicas mostraram que o alelo mais comum foi o *NAT2*5B* (37.9%), seguido do *NAT2*6* (32.8%) e do *NAT2*4* (21.1%) (Lemos et al., 1998; Lemos et al., 1999).

Outro estudo realizado num grupo de 114 doentes com cancro colo-rectal, e em 201 controlos, encontrou frequências semelhantes (Gil J, Lechner M, 1998).

Concluimos que pelo menos metade dos doentes que acorrem aos cuidados de saúde são AL e poderão beneficiar de uma dosagem terapêutica personalizada, para uma mais eficaz e segura terapêutica da tuberculose. Posteriormente, iniciar-se-ão estudos prospectivos com o objectivo de determinar se a individualização da terapêutica, de acordo com a genotipagem, diminui a ocorrência de hepatotoxicidade.

6- Conclusões

6- Conclusões

A tuberculose continua a ser um grave problema de saúde pública a nível mundial, e em Portugal, a situação é uma das piores da Europa.

A INH, fármaco essencial à terapêutica da tuberculose metabolizado por acetilação pela enzima polimórfica NAT2, apresenta uma variabilidade farmacocinética que pode afectar tanto a eficácia terapêutica como a emergência de efeitos secundários graves como a hepatotoxicidade.

Tal como foi demonstrado em vários estudos, há uma correlação estreita entre o genótipo do *NAT2*, gene que codifica a enzima NAT2, e os três fenótipos de acetilação, AR, AI e AL, de tal modo que é possível seleccionar a dose a administrar a cada doente estudando o seu genótipo.

Quanto à hepatotoxicidade, a sua causa permanece obscura, não havendo uma correlação clara com os fenótipos de acetilação. A maioria dos estudos aponta no sentido de que os genótipos do *NAT2* correspondentes a AL aumentam a susceptibilidade para a ocorrência de hepatotoxicidade mas com um efeito modesto. Outras causas e outros genes poderão estar envolvidos na etiopatogenia desta temida complicação. Dos vários genes pesquisados, o *CYP2E1* e o *GSTM1*, são aqueles para os quais há alguma evidência de envolvimento, mas com resultados ainda mais contraditórios do que para o *NAT2*.

Actualmente, a genotipagem do *NAT2* pode ser realizada por técnicas de fácil acesso e pouco onerosas, que podem com vantagem substituir os estudos farmacocinéticos.

Em Portugal, 50% dos doentes é AL e poderiam beneficiar de uma optimização da dose de INH.

São necessários estudos prospectivos que permitam avaliar a utilidade clínica da genotipagem e da personalização da dosagem de INH, para a otimização da terapêutica da tuberculose.

Os doentes com genótipo correspondente a AL parecem apresentar uma maior susceptibilidade à neuropatia periférica e à hepatotoxicidade, embora a correlação seja modesta. Isto indica que a genotipagem *NAT2* é útil em avaliar doentes susceptíveis à sua ocorrência (sobretudo em locais onde a incidência de AL seja superior). Nos casos de alto-risco, isto é, doentes AL, atenção redobrada, incluindo testes de função hepática por rotina, desde estados precoces da medicação, serão úteis para prevenir o seu desenvolvimento.

Além disso, doses de INH mais ajustadas e seguras podem ser determinadas no início do tratamento se o genótipo individual *NAT2* for conhecido previamente.

Estudos demonstram também que, por vezes, alguns AR não respondem satisfatoriamente à dose diária de INH, enquanto que, inversamente, a mesma dose pode ser excessiva para os AL. As recomendações da INH devem ser, portanto, revistas, tendo em consideração os genótipos *NAT2* individuais.

Por outro lado, a descontinuação do tratamento anti-tuberculose devido a reacção hepatotóxica e insuficientes doses de INH podem levar a riscos aumentados de desenvolvimento de resistência da estirpe micobacteriana e prolongar a duração do tratamento (Ohno et al., 2000).

Em comparação com os métodos usados para detectar o fenótipo do gene *NAT2*, a genotipificação deste gene através de PCR ou RFLP é menos invasivo, mais barato, confiável, reproduzível e viável para uma pesquisa em massa (Huang et al., 2002).

Na população portuguesa em particular, verifica-se que a genotipagem tem interesse e aplicabilidade, nomeadamente através da avaliação custo/benefício da genotipagem. O custo de um transplante hepático, segundo a Tabela de Preços do Sistema Nacional de Saúde publicada em Diário da República 1ª série – N°147 – 31 de Julho de 2009, Portaria N°839-A/2009, é de 103103.21€. Ora, o custo médio de um estudo genotípico é de cerca de 42.80€ (segundo a mesma fonte). Deste modo, verifica-se uma diferença muito substancial entre o custo de um transplante e o estudo genotípico, concluindo-se, portanto, que a genotipificação *NAT2* dos doentes pode ser uma grande mais-valia em termos económicos, para além das vantagens referidas anteriormente da influência do genótipo *NAT2* a nível da eficácia e da toxicidade da terapêutica, neste caso com INH.

Contudo, é necessário ter em conta que ainda existem algumas dificuldades e controvérsias, no que diz respeito por exemplo à multiplicidade de factores envolvidos a influenciar as concentrações plasmáticas do fármaco e, por conseguinte, a toxicidade, como é o caso da idade, perfil genético do próprio bacilo de Koch, bem como a influência de outros genes como já foi referido anteriormente. A presença de lesão hepática prévia ao tratamento, pode também influenciar sobremaneira a toxicidade hepática do fármaco.

Por fim, gostaria de referir que no âmbito da farmacogenética já se encontra disponível um teste recentemente aprovado pela Organização Mundial de Saúde chamado “Hain GenoType® MTBDR plus test” que detecta mutações específicas para um rápido diagnóstico da tuberculose e teste da resistência a fármacos, podendo informar a decisão de se incluir INH em altas doses ao tratar doentes com TB mono-resistente à INH, TBMR ou TBXDR. A presença de mutações no gene *inhA* ou região promotora confere geralmente resistência a baixos níveis de à INH que pode ser

ultrapassada por altas doses de INH. As mesmas mutações também conferem resistência a etionamida indicando pouco benefício da sua inclusão no tratamento de segunda linha nesses casos. Esta informação tem bastante interesse clínico visto que as mutações *inhA* relacionam-se com uma grande proporção de resistência à INH, e regimes terapêuticos otimizados são cruciais para melhorar os resultados clínicos e reduzir a propagação de TB resistente (Warren et al., 2009).

Bibliografia

Bibliografia

- Agal S, Baijal R, Pramanik S, et al. (2005) Monitoring and management of antituberculosis drug induced hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol* 20:1745-1752.
- Cascorbi et al. (1995) Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am. J. Hum. Genet.* 57:581-592.
- Cho et al. (2007) Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 87:551-556.
- Conte et al. (2002) Effects of gender, AIDS, and acetylator status on intrapulmonary concentrations of isoniazid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46:2358-2364.
- Cranswick N, Mulholland K (2005) Isoniazid treatment of children: can genetics help guide treatment? *Arch Dis Child* 90:551-553.
- Crettol et al. (2010) Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Metabolism. *Current Pharmaceutical Design* 16:204-219.
- Daly AK (2010) Drug-induced liver injury: past, present and future. *Pharmacogenomics* 11(5):607-11.
- Diário da República. 1ª série – Nº 147 – 31 de Julho de 2009; Portaria nº839-A/2009.
- Donald et al. (2004) The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid. *Clinical Infectious Diseases* 39:1425-30.

- Donald et al. (2007) The influence of dose and N-acetyltransferase-2 (NAT2) genotype and phenotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of isoniazid. *European Journal of Clinical Pharmacology* 63:633-639.
- Donald PR, Sirgel FA, Botha FJ, et al. (1997) The early bactericidal activity of isoniazid related to its dose size in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 156:895-900.
- Duarte et al. (2010) Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. *Revista Portuguesa de Pneumologia* XVI(4):559-572.
- Dupret J, Rodrigues-Lima F (2005) Structure and regulation of the drug-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases. *Current Medicinal Chemistry* 12(3):311-318.
- Fauci et al. (2008) *Harrison Medicina Interna*. 17. edição. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil.
- Gil J, Lechner M (1998) Increased frequency of wild-type arylamine-N-acetyltransferase allele NAT2*4 homozygotes in Portuguese patients with colorectal cancer. *Carcinogenesis* 19:37-41.
- Goldenkova-Pavlova et al. (2006) Comparative analysis of N-acetylation polymorphism in humans as determined by phenotyping and genotyping. *Russian Journal of Genetics* 42(8):947-953.
- Gumbo et al. (2007) Isoniazid bactericidal activity and resistance emergence: integrating pharmacodynamics and pharmacogenomics to predict efficacy in different ethnic populations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(7):2329-2336.

- Hall et al. (2009) Treatment of Active Pulmonary Tuberculosis in Adults: Current Standards and Recent Advances. *Pharmacotherapy* 29(12):1468-1481.
- Hiratsuka et al. (2002) Genotyping of the N-acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug Metabolism Pharmacokin.* 17(4):357-362.
- Huang et al. (2007) Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H:quinine oxidoreductase, glutathione *S*-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *Journal of Hepatology* 47:128-134.
- Huang HS, Chern HD, Su WJ, et al. (2002) Polymorphisms of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*; 35:883-889.
- Kinzig-Schippers et al. (2005) Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses?. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(5):1733-1738.
- Kubota et al. (2007) Dose-escalation study of isoniazid in healthy volunteers with the rapid acetylator genotype of arylamine N-acetyltransferase 2. *European Journal of Clinical Pharmacology* 63(10):927-933.
- Lee et al. (2010) NAT2 and CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to first-line anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *International Journal of Tuberculosis & Lung Disease* 14(5):622-626.
- Leiro et al. (2008) Influence of glutathione *S*-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver International* 835-839.

- Lemos M, Cabrita F, Silva H, Vivan M, Plácido F, Regateiro F (1999) Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis* 20:101-105.
- Lemos M, Regateiro F (1998) N-acetyltransferase genotypes in the Portuguese population. *Pharmacogenetics* 8:561-564.
- McQueen et al. (1982) Relationship between the genetically determined acetylator phenotype and DNA damage induced by hidralazine and 2-aminofluorene in cultured rabbit hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1269-1272.
- Millard et al. (1996) Isoniazid-Related Fatal Hepatitis. *WJM* 164, 6:486-491.
- Miller et al. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16(3):1215.
- Namora N, Mesquita L, Alcobia C, Cordeiro C, Silva H (2010) Genotipagem do NAT2: aplicação na terapêutica da isoniazida numa população portuguesa. Poster apresentado no Congresso de Pneumologia do Centro.
- Ohno et al. (2000) Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 4(3):256-261.
- Peloquin et al. (1999) Pharmacokinetics of isoniazid under fasting conditions, with food, and with antacids. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3(8):703-710.
- Sharma K., Balamurugan A., Saha PK, Pandey RM, Mehra NK (2002) Evaluation of Clinical and Immunogenetic Risk Factors for the Development of Hepatotoxicity during Antituberculosis Treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166(7):916-919.
- Singh et al. (2009) Study of NAT2 gene polymorphisms in an Indian Population. *Molecular Diagnostics & Therapeutics* 13(1):49-58.

- Sun F, Chen Y, Xiang Y, Zhan S. (2008) Drug-metabolising enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 12(9):994:1002.
- Vuilleumier et al. (2006) CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *European Journal of Clinical Pharmacology* 62:423-429.
- Walraven et al. (2008) Structure/Function Evaluations of Single Nucleotide Polymorphisms in Human N-acetyltransferase. *Curr Drug Metabolism* 9(6):471-486.
- Wang L (2010) Pharmacogenomics: a systems approach. *WIREs Systems Biology and Medicine* 2:3-22.
- Warren et al. (2009) The clinical relevance of Mycobacterial pharmacogenetics. *Tuberculosis* 89:199-202.
- Weiner et al. (2003) Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once-weekly isoniazid and rifapentine. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167:1341-1347.
- Yamada S, Tang M, Richardson K, et al. (2009) Genetic variations of NAT2 and CYP2E1 and isoniazid hepatotoxicity in a diverse population. *Pharmacogenomics*; 10:1433-1445.
- Yee et al. (2003) Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167:1472-1477.

Sites consultados:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.uniprot.org/>