

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

***Efeitos da rifampicina na farmacocinética e
hepatotoxicidade da isoniazida***

Helene Jorge De Rosa

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Araraquara - SP
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

***Efeitos da rifampicina na farmacocinética e
hepatotoxicidade da isoniazida***

Helene Jorge De Rosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Araraquara - SP

2006

Dedicatória

Quero, não só dedicar, mas acima de tudo agradecer a Deus por tudo o que tenho e sou e conquistei.... Obrigada !

Dedico este trabalho aos meus familiares, que sempre estiveram presentes em todos os momentos de minha vida, fossem eles de alegria ou de tristeza, me apoiando com palavras de incentivo e acima de tudo de amor.

Mais que uma dedicação, eu gostaria de agradecer, sinceramente, a minha mãe, Marlene e ao meu pai, Henrique, pelos anos de amor e abnegação dedicados a mim.... obrigada por me ensinarem a procurar ser uma pessoa “melhor” a cada novo dia !

Dedico este trabalho também ao meu irmão Maurice, por sempre ter sido um “exemplo” positivo em minha vida.... e a minha cunhada Fernanda, cujos passos profissionais me serviram de estímulo..... não poderia deixar de mencionar a doce presença dos meus amados sobrinhos, Gustavo e Luiza.... raios de luz inovadora em minha vida !

Em especial, dedico este trabalho a uma pessoa que durante toda a caminhada para a conclusão deste projeto esteve ao nosso lado, como orientadora, incentivadora, como professora.... corrigindo, com respeito, nossos erros, mas

sem nunca deixar que isso nos desanimasse.... comemorando conosco cada vitória alcançada, sem permitir que isso fosse motivo para nos acomodarmos... pelo contrário... dedico, de todo meu coração, esta dissertação, a nossa mais que amiga... a nossa “Mama”... a quem aprendemos a amar e admirar, tendo-a como um exemplo de pessoa a seguir..... e agradeço a ela por acreditar em nosso potencial e por nos mostrar como a “Farmacocinética” é maravilhosa... e por nos fazer amar a “pesquisa”.... trabalhando sempre em equipe.... sempre buscando um bem comum.... obrigada Rô !

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, na qual não só me graduei, mas acima de tudo me “formei”, tendo adquirido conhecimentos, experiências e exemplos de conduta profissional e pessoal através da inesquecível convivência com professores, amigos, colegas e funcionários, o que me propiciou condições suficientes para a realização e conquista deste título de Mestre.

Agradecimentos especiais

É Helen Mariana Baldan.... a “nossa Berê”só nós sabemos o quanto nos dedicamos para a realização deste projeto, que não é meu nem seu ...é NOSSO... de nossa equipe.... e eu quero te agradecer pela sua amizade, companheirismo, paciência, otimismo e por sua alegria contagiante.... obrigada por tudo.... e vamos continuar ainda constituindo esta “dupla dinâmica” em outros projetos... de trabalho.. e de vida !

Agradeço a toda minha família, pais, irmão, avós, tios, tias, primos e primas.... pelos mimos de amor... pelas preces, apoio e pelas palavras de carinho, incentivo e reconhecimento.... obrigada !

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, pela confiança, paciência, pelos ensinamentos.... por esclarecer, incansavelmente, por onde passa o “WET-PRIMER” no HPLC automático.... Obrigada pela orientação e pela amizade !

À Prof. Dra. Márcia Silva, professora do departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, pela produção de reagentes indispensáveis para a realização do nosso projeto e por, em mais um momento de nossas vidas, ter sido uma atenciosa “educadora”... e uma amiga !

Agradecimentos

Agradeço ao querido Marcus, técnico do laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, pela sua fundamental colaboração, estando sempre disponível e paciente para nos ajudar com nossos “amiguinhos brancos”... tratando-os com respeito... e amor ! Obrigada Marcus... nunca vamos esquecê-lo !

Ao Celso, do biotério central desta instituição, que sempre nos socorreu nos momentos de “aperto” , garantindo a execução de nosso trabalho.

Agradeço aos nosso “queridos e divertidos” amigos do almoxarifado, por nos receber sempre tão bem.... vocês são nota 10 !

À toda “equipe de amigos” do laboratório de Bioequivalência: Berê, Raquel, Kelly, Camila, Thalita, Sandrinha e Silvio. Obrigada pela colaboração, torcida e incentivovocês todos moram no meu coração e juntos formamos uma “família” unida por laços de amizade, carinho e objetivos comuns... a Bioequivalência se tornou um segundo lar..... inesquecível !

Aos amigos da farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, Fábio (Quasy), Tarcício, Fartura, Karina, Vampeta, Rô e a Bete pelo apoio e auxílio... e pelos momentos de descontração.

À CNPq por financiar os experimentos realizados através de verba destinada ao projeto.

À FURP (Fundação do Remédio Popular) por, atenciosamente, nos ceder fármacos fundamentais para o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos que contribuíram de maneira mais dedicada para que esse trabalho desse certo, meus “140” amigos Wistar, que forneceram, sem reclamar, nem pestanejar, suas vidas em experimentos preparatórios, definitivos, repetições e conclusivos. Sem vocês, este trabalho teria fracassado certamente. Espero que eu consiga crescer o suficiente para um dia poder encontrar com vocês no céu.

Ao serviço técnico de Biblioteca e ao serviço de apoio à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara pelo auxílio na obtenção, atualização e correção das referências bibliográfica, em especial ao Moacir e à Natalina Escremin.

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas (Cláudia, Laura e Sônia) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), pela atenção, paciência e esclarecimentos... obrigada !

Às minhas amigas do coração Vanessa e Bia, que eu considero como irmãs... obrigada por acreditarem em mim, por, mesmo a distância, estarem

sempre presentes em minha vida.... comemorando comigo minhas vitórias... e enxugando minhas lágrimas quando necessário.... amo vocês ...obrigada !

Obrigada, Jean por ter estado ao meu lado.... pelo carinho, incentivo, apoio... por muitas vezes me ajudar a “desvendar” alguns “mistérios” da química orgânica relacionados ao projeto... Obrigada pelos conselhos.... e por me ensinar a ser um pouco mais racional...

Agradeço ao meu querido amigo Serginho V. Grande, pela amizade, carinho, atenção, paciência... pelo apoio e pelas palavras de incentivo... obrigada Serginho por me ajudar a “enxergar” o mundo de uma forma melhor... por me fazer entender como é importante conhecermos a nós mesmos e termos vontade e perseverança para evoluirmos..... você é um Anjo amigo que surgiu na minha vida !

Obrigada aos meus amigos da minha “terrinha natal”..... Chris, Lena, Milena, Ariadne, André, Vítor, Uebinho, Isabela e tantos outros obrigada por entenderem a minha ausência em tantos momentos importantes... mas saibam que meus pensamentos e meu coração nunca deixaram de estar com vocês... Obrigada por se orgulharem de mim, pelo apoio e solidariedade.... amo todos vocês !

A todos que eu não citei aqui, mas que de alguma forma contribuíram para eu concluir esta dissertação. Obrigada a todos

ABREVIATURAS

α ou $K\alpha$: constante de velocidade de distribuição

AAS: ácido acetil-salicílico

AcHz: acetilhidrazina

AcINH: acetilisoniazida

AGA: alfa glicoproteína ácida

ALT: alanina aminotransferase

ASAL: ácido arginino-succínico liase

AST: aspartato aminotransferase

AUC: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

AUC_{0-24}^{ss} : área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo no intervalo de dose de 24h

β ou K_{el} : constante de velocidade de eliminação

CA: cinamaldeído

C_{max} : concentração plasmática máxima

Cl_T/F : *clearance* total aparente

$C_{p_{ss}}$: concentração média no estado de equilíbrio

CV: coeficiente de variação

CYP450: citocromo P450

CYP2E1: citocromo P450 isoforma 2E1

EPM: erro padrão da média

ES: erro sistemático

ETB: etambutol

DACHz: diacetil-hidrazina

Hz: hidrazina

Ka: constante de velocidade de absorção

INH: isoniazida

InhA: enoil acil redutase

NAT-2: N-acetiltransferase 2

PYR: pirazinamida

RMP: rifampicina

S: estreptomicina

$t_{1/2 \alpha}$: meia vida de absorção

$t_{1/2 \alpha}$: meia vida de distribuição

$t_{1/2 \beta}$: meia vida de eliminação

TCA: ácido tricloro acético

t_{max}: tempo necessário para atingir a C_{max}

UV-VS: ultra-violeta – visível

Vd/F: volume de distribuição aparente

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	3
1. Introdução.....	5
1.1. Isoniazida: farmacologia clínica e parâmetros farmacocinéticos.....	8
1.2. Rifampicina: farmacologia clínica e parâmetros farmacocinéticos.....	14
1.3. Hepatotoxicidade induzida por drogas.....	19
2. Justificativa.....	27
3. Objetivos.....	28
4. Casuística e métodos.....	29
4.1. Casuística.....	29
4.2. Protocolo experimental.....	30
4.3. Métodos analíticos.....	34
4.3.1. Reagentes.....	34
4.3.2. Sistema cromatográfico.....	34
4.3.4. Procedimento analítico para a determinação de INH e metabólitos	35
4.3.5. Preparação das amostras para determinação de isoniazida e metabólitos em soro.....	37
4.3.6. Curvas de calibração.....	37
4.3.6.1. Curva de calibração da isoniazida (INH).....	38
4.3.6.2. Curva de calibração da hidrazina (Hz).....	38

4.3.6.3. Curva de calibração da acetilisoniazida (AcINH).....	39
4.3.6.4. Curva de calibração da acetilhidrazina (AcHz).....	41
4.3.7. Validação do método analítico.....	42
4.3.7.1. Linearidade.....	42
4.3.7.2. Limite de Detecção.....	43
4.3.7.3. Limite de Quantificação.....	43
4.3.7.4. Precisão e exatidão intra e inter ensaios.....	44
4.3.7.5. Seletividade.....	44
4.3.7.6. Estabilidade.....	45
4.4. Análise Farmacocinética.....	45
4.5. Determinação da atividade enzimática de AST e ALT.....	47
4.6. Análise estatística.....	48
5. Resultados.....	49
5.1. Determinação da isoniazida e metabólitos.....	49
5.2. Disposição cinética da INH e metabólitos.....	57
5.3. Parâmetros bioquímicos.....	63
6. Discussão.....	66
7. Conclusões.....	81
8. Referências bibliográficas.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Metabolismo da isoniazida e formação de intermediários hepatotóxicos.....	12
Figuras 2A e 2B- Cromatogramas referentes à análise de isoniazida e hidrazina em soro.....	51
Figura 3- Cromatograma referente ao branco do soro utilizado para a construção das curvas de calibração.....	51
Figuras 4A e 4B- Curvas de calibração em soro da INH sem hidrólise e após procedimento com hidrólise.....	51 52
Figura 5- Curva de calibração em soro para acetilisoniazida.....	52
Figura 6- Curva de calibração em soro para hidrazina.....	53
Figura 7- Curva de calibração em soro para acetilhidrazina.....	53
Figura 8- Disposição cinética da INH e metabólitos do grupo tratado com INH..	58
Figura 9- Disposição cinética da INH e metabólitos do grupo tratado com a associação INH e RMP.....	59
Figura 10- Comparação entre os grupos INH e INH+RMP em relação aos parâmetros farmacocinéticos.....	61
Figura 11-Comparação entre os grupos INH e INH + RMP em relação à AUC_{0-24}^{ss}	62
Figura 12- Razão entre metabólito e composto precursor.....	63
Figura 13- Razão entre a atividade de AST pós tratamento e pré tratamento....	64
Figura 14- Razão entre a atividade de ALT pós tratamento e pré tratamento....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fase móvel do sistema cromatográfico em modo gradiente.....	35
Tabela 2- Estudo de seletividade do método para determinação de INH e metabólitos em soro.....	54
Tabela 3- Limites de confiança do método para determinação de INH e metabólitos em soro (n=3).....	55
Tabela 4- Precisão e exatidão do método para determinação de INH e metabólitos em soro.....	56
Tabela 5- Estabilidade do método para determinação de INH e metabólitos em soro (n=5).....	57
Tabela 6- Parâmetros farmacocinéticos da isoniazida. Dados expressos como média (EPM); n=5.....	59
Tabela 7- AUC da isoniazida e metabólitos. Dados expressos como média (EPM); n=5.....	60
Tabela 8- Razão entre metabólito e composto precursor. Dados expressos como média (EPM); n=5.....	60
Tabela 9- Razão entre a atividade de AST e ALT pós e pré tratamento. Dados expressos como média (EPM); n=5.....	64

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da rifampicina (RMP) sobre os parâmetros farmacocinéticos da isoniazida (INH), sobre a produção de seus metabólitos e sobre a sua hepatotoxicidade.

Foram utilizados 140 ratos (Wistar, machos, peso médio 250g) que receberam, por gavagem, durante 21 dias: Grupo I - água estéril (n = 20); Grupo II - INH (100mg/Kg) (n = 50); Grupo III - RMP (100mg/Kg) (n = 20) e Grupo IV- INH (100mg/Kg) + RMP (100mg/Kg) (n = 50).

Anteriormente ao início do experimento, o sangue de todos os animais foi coletado pela cauda para determinação da atividade sérica de AST e ALT, cujos valores foram considerados como basais. No 21º do experimento os animais foram sacrificados por decapitação e o material biológico obtido foi utilizado para a determinação da atividade de AST e ALT e para a análise dos parâmetros farmacocinéticos da INH nos grupos II e IV. A cinética da isoniazida e de seus metabólitos foi investigada com base na relação *concentração plasmática x tempo* a partir de amostras seriadas de sangue em 10 tempos diferentes (0; 15'; 30'; 45'; 60'; 1,5h; 3h; 6h; 12h; e 24h); para cada tempo de coleta foram empregados 5 ratos (5 replicatas).

As amostras de soro foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 10%, derivatizada com cinamaldeído 1% e analisada por HPLC. Para a determinação dos derivados acetilados acetilisoniazida (AcINH) and acetilhidrazina (AcHz) foi realizada hidrólise prévia com ácido clorídrico 6 M.

Os parâmetros farmacocinéticos da INH que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, teste t- student), média (EPM) foram: Grupo INH vs Grupo INH + RMP: $t_{1/2\alpha} = 1,38$ (0,07) vs $0,98h$ (0,08) ; $K\alpha = 0,51$ (0,024) vs $0,73$ (0,07); $t_{1/2\beta} = 3,4$ (0,026) vs $2,7$ (0,14); $Kel = 0,21$ (0,015) vs $0,26$ (0,012); $Cl_T/F = 0,68$ (0,016) vs $1,35$ (0,085); $Vd/F = 3,32$ (0,19) vs $5,18$ (0,2); AUC^{0-24}_{ss} da isoniazida = $146,36$ (3,25) vs $75,42$ (5,23); AUC^{0-24}_{ss} da hidrazina = $2,87$ (0,07) vs $1,3$ (0,04). As razões AUC^{0-24} metabólito/ AUC^{0-24} precursor que apresentam diferenças foram: Grupo INH vs Grupo INH + RMP: hidrazina/acetilhidrazina = $0,143$ (0,005) vs $0,052$ (0,005); acetilhidrazina/isoniazida = $0,754$ (0,017) vs $1,379$ (0,228) e acetilhidrazina/acetilisoniazida = $0,182$ (0,005) vs $0,265$ (0,045).

A atividade de AST no 21º dia de experimento atingiu valores superiores aos basais para os grupos que receberam INH isolada e INH + RMP, enquanto que para os grupos controle e RMP estes valores se mostraram sem alterações estatisticamente significativas em relação ao tempo zero de coleta. A atividade de ALT no 21º dia de tratamento foi inferior aos valores considerados basais para todos os grupos estudados, com exceção do grupo que recebeu INH isoladamente.

Nossos resultados mostraram acentuada diminuição da AUC^{SS}_{0-24} da Hz e INH, menores valores de ALT e iguais valores de AST no grupo que recebeu a associação medicamentosa em relação ao grupo INH isolada, sugerindo que a associação INH+RMP não resulta em aumento da hepatotoxicidade da INH apesar das diferenças observadas nas concentrações plasmáticas desses metabólitos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the hepatotoxicity, pharmacokinetic parameters and biotransformation of isoniazid when rats were treated with isoniazid (INH); rifampicin (RMP); and INH + RMP. Daily doses of the tuberculostatic drugs were administrated intragastrically to the animals (Wistar rats) for one period of 21 days as follow: sterile water (group I, control); INH (100mg/Kg) (group II), RMP (100mg/Kg) (group III); INH (100mg/Kg) + RMP (100mg/Kg) (group IV). The serum levels of the biomarkers aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined before the administration of the drugs (basal) and after the 21 days treatments. On day 21, blood samples were obtained before and 15'; 30'; 45'; 60'; 1,5; 3h; 6h; 12h and 24 hours after the dose. (five animals for each point). The blood samples were deproteinized with 10% trichloroacetic acid, derivatized by 1% cinnamaldehyde and analyzed by liquid chromatograph. For the determination of the acetylated metabolites acetylisoniazid (AcINH) and acetylhydrazine (AcHz) a previous hydrolysis with 6 M hydrochloride acid was performed. The results are presented as mean and SEM. The pharmacokinetic parameter of the INH and its metabolites AcINH and hydrazine (Hz) were compared between the groups ($p < 0.05$, Student t-test). The results significantly different were: group INH vs Group INH + RMP): $t_{1/2\alpha} = 1,38 (0,07)$ vs $0,98h (0,08)$; $K\alpha = 0,51 (0,024)$ vs $0,73 (0,07)$; $t_{1/2\beta} = 3,4 (0,026)$ vs $2,7 (0,14)$; $Kel = 0,21 (0,015)$ vs $0,26 (0,012)$; $Cl_T/F = 0,68 (0,016)$ vs $1,35 (0,085)$; $Vd/F = 3,32 (0,19)$ vs $5,18 (0,2)$; AUC^{0-24}_{ss} for INH =

146,36 (3,25) vs 75,42 (5,23); AUC_{ss}^{0-24} for Hz = 2,87 (0,07) vs 1,3 (0,04) e AUC_{ss}^{0-24} for AcINH = 110,25 (2,45) vs 101,9 (1,43). The ratio AUC^{0-24} metabolite/ AUC^{0-24} precursor that showed significant difference was: group INH vs group INH + RMP: Hz/AcHz = 0,143 (0,005) vs 0,052 (0,005); AcHz/INH = 0,754 (0,017) vs 1,379 (0,228) and AcHz/AcINH = 0,182 (0,005) vs 0,265 (0,045).

The activity of AST on 21 day was higher compared to basal level for the groups that were treated with INH and INH + RMP. However no significant difference was noted for the group that received RMP alone. The activity of ALT on 21 day was lower compared to the basal level for all groups except for the animals that receive INH alone.

In conclusion, we found that the co-administration of RMP during the treatment of rats with INH caused a significant decrease in the AUC for INH, Hz. The drug combination also caused a decrease in the ALT level, but no difference was found for the AST biomarker. These results suggest that the INH + RMP association, though caused a significant alteration on pharmacokinetic parameter, was not able to exacerbate the hepatotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença grave e altamente transmissível. Segundo a Organização Mundial de Saúde, ocorrem cerca de 1,9 milhões de mortes anualmente, em todo o mundo, por essa doença. No Brasil, o tratamento da tuberculose é considerado prioridade da política de saúde do Governo Federal, tendo em vista que a doença provoca anualmente, no país, cerca de 6 mil mortes.

A quimioterapia da tuberculose, preconizada pelo Consenso Brasileiro (1997), envolve a associação dos fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PRZ) por um período de até seis meses. Outros fármacos são utilizados no tratamento da tuberculose quando não há resposta adequada ao esquema inicial, tais como etambutol (ETB) e estreptomicina (S). Durante o período de tratamento, o paciente recebe doses diárias destes fármacos, administrados em formulações separadas, uma vez ao dia.

Essa terapia medicamentosa apresenta índices de abandono de cerca de 20% dos casos; levando ao aparecimento de microorganismos resistentes e agravamento da doença (DOUGLAS & MCLEOD, 1999).

Entre os principais aspectos relacionados à dificuldade de aderência do paciente ao tratamento medicamentoso da tuberculose estão o tratamento prolongado e o aparecimento de efeitos adversos, entre estes a intolerância gastrointestinal que pode advir de qualquer fármaco antituberculose e que leva ao aparecimento de inapetência, náuseas, azia, dor epigástrica e abdominal. Em

geral estes sintomas estão associados ao desenvolvimento da hepatite decorrente do efeito tóxico da isoniazida (TANEJA & KAUR, 1990).

Diversos autores reportam a hepatotoxicidade como o efeito adverso mais grave da isoniazida, com ocorrência em 16 a 20% dos adultos jovens que recebem o fármaco (WALUBO, 1998), sendo expressa laboratorialmente através da elevação das transaminases séricas (ALT, AST), elevação da fosfatase alcalina (ALP) e bilirrubinemia (CASTILLO et al., 1981).

O início dos danos hepáticos ocorre tipicamente dentro dos três primeiros meses de tratamento, freqüentemente de caráter leve a moderado e que desaparece sem interrupção da terapêutica. Em alguns casos, no entanto, aparecem sérios danos hepáticos com conseqüências fatais, sendo que a susceptibilidade a esses efeitos hepatotóxicos relacionam-se os fatores idade, sexo, ingestão crônica de álcool, politerapia, polimorfismo genético e sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo do fármaco (MADDREY, 2005; FERNANDES et al., 2004; PANDE et al., 1996).

Os pacientes em tratamento com isoniazida necessitam de acompanhamento laboratorial contínuo, realizando testes para a avaliação da função hepática e, apesar do controle realizado através da análise de parâmetros bioquímicos, fatalidades associadas a hepatotoxicidade da droga têm sido documentadas (FOUNTAIN et al., 2005; MOITINHO et al., 1996; CASTILLO et al., 1981).

Diversos mecanismos têm sido propostos para a elucidação da patogênese da hepatite induzida em humanos por isoniazida (DAVIES, 1998; ELLENHORN, 1998; TIMBRELL et al., 1980). Entre esses, o de maior aceitação é aquele que

propõe que o metabolismo da INH leva à formação de compostos hepatotóxicos e que a RMP, fármaco freqüentemente associado no tratamento da tuberculose e potente indutor de CYP2E1, aumenta a toxicidade da isoniazida por aumento da produção desses metabólitos reativos (SHARMA, 2004; DOUGLAS & MCLEOD, 1999; SKAKUN et al., 1985; REY, 2001).

O uso de associações medicamentosas pode levar a modificações na resposta à farmacoterapia das drogas uma vez que ocorra alguma interação entre os fármacos associados.

Sharma (2004) reporta que a incidência de hepatotoxicidade de 1,1% em pacientes tratados com RMP aumenta para 2,6% em pacientes que recebem a associação INH+RMP. Ao aumento do risco de hepatotoxicidade desta associação atribui-se a interação farmacocinética.

É realmente possível que a administração concomitante de fármacos leve a diferenças no metabolismo de um ou mais fármacos da associação. Desta forma é cabível a hipótese de que durante a administração de INH com outros tuberculostáticos, como a RMP e a PYR, ocorra diferenças no efeito hepatotóxico conhecidamente causado pela INH, considerando que o mecanismo envolvido na produção deste efeito esteja relacionado com o seu metabolismo.

Assim a administração simultânea de vários fármacos requer muita cautela, considerando a possibilidade de ocorrência de interações medicamentosas que podem ter conseqüências prejudiciais ao organismo, ou mesmo levem a ausência do efeito terapêutico desejado (SEIZI OGA, 2002).

Para a avaliação da hepatotoxicidade em animais têm sido utilizados critérios tais como aparecimento de necrose tissular e inflamação intralobular no

exame histopatológico e níveis séricos das transaminases três vezes superiores aos estabelecidos como referência (ATTRI et al., 2000; CASTILLO et al., 1981).

Estudos realizados por Noda e colaboradores (1983) demonstraram que um grupo de animais que recebeu doses diárias de INH, pré-tratados com RMP, apresentou maior dano hepático que os animais do grupo controle devido à indução de CYP450 pela RMP (NODA et al., 1983). Tasduq et al (2005) avaliaram as alterações das transaminases (AST e ALT), fosfatase alcalina (ALP) e bilirrubina em animais tratados com a associação INH+RMP e observaram um aumento de 220% de ALT, 148% para AST, 101% para ALP e 96% para bilirrubina quando comparado ao grupo controle, o qual recebeu apenas o veículo utilizado para a administração dos fármacos experimentados.

A INH, administrada em dose única, não causa necrose hepática em ratos controle ou com indução enzimática por fenobarbital. No entanto, a INH causa necrose hepatocelular dispersa quando administrada em dose múltipla (TIMBRELL, 1979). Dessa forma, a investigação da hepatotoxicidade induzida pela INH em ratos deve ser realizada através da administração de doses múltiplas.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da administração simultânea de RMP sobre os parâmetros farmacocinéticos da INH, sobre a formação dos seus metabólitos e sobre os efeitos hepatotóxicos marcados pela atividade de ALT e AST.

1.1. Isoniazida: farmacologia clínica e parâmetros farmacocinéticos

⇒ **Mecanismo de ação:**

A isoniazida (INH) é um fármaco antibacteriano que inibe a síntese do ácido micólico, componente essencial da parede celular da micobactéria, sendo as enzimas enoil-acil redutase (InhA) e β -cetoacil-acil sintase responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa (LEI et al., 2000).

A isoniazida é utilizada tanto no tratamento profilático quanto na doença ativa da tuberculose. Embora seu exato mecanismo de ação seja desconhecido (GOODMAN & GILMAN, 2004), há alguns mecanismos propostos, entre eles o que propõe que a INH converte-se ao isocotinato, que funciona como antimetabólito do ácido isonicotínico. O isocotinato é incorporado ao NAD^+ no lugar do ácido nicotínico. O falso NAD^+ não é capaz de catalisar a reação de oxirredução normal (SILVA, 1997).

Em um outro estudo realizado por Lei e colaboradores (2000) relata-se que a isoniazida é um pró-fármaco e sua função tuberculostática requer *in vivo* a ativação por KatG, uma enzima com atividade de catalase e peroxidase (SHERMAN & STOVER, 1996).

⇒ Farmacocinética:

• Absorção

A isoniazida é rapidamente absorvida no intestino (MARIAPPAN et al., 2003). Os picos das concentrações plasmáticas (3 a 5 $\mu\text{g/mL}$) (GOODMAN & GILMAN, 2004; PELOQUIN et al., 1997) são atingidos dentro de 1 a 2 horas após sua ingestão (DOUGLAS & MCLEOD, 1999; GOODMAN & GILMAN, 1998). A

concentração média plasmática nos acetiladores rápidos é de 30 a 50% daquela presente em acetiladores lentos.

A absorção e a biodisponibilidade são reduzidas quando a isoniazida é administrada juntamente com alimentos (SELF, 1999; GOODMAN & GILMAN, 2004) e antiácidos (GOODMAN & GILMAN, 2004). Peloquin et al (1999) afirmam que há uma diminuição na AUC da INH em 12% quando esta é administrada com alimentos ricos em gordura.

Existem evidências de apreciável efeito de primeira passagem após a administração oral de isoniazida. Essas evidências baseiam-se no fato de que a excreção renal do fármaco sob a forma inalterada é de aproximadamente 29% após a administração oral e de que percentuais mais elevados são encontrados após administração intravascular. No entanto, não se encontram estabelecidos os valores da biodisponibilidade oral (GOODMAN & GILMAN, 2004).

• Distribuição

Após a absorção a INH é distribuída por todo o organismo, tecidos e fluidos (pleural, ascítico, saliva, cérebro espinhal) em níveis similares aos níveis séricos. A isoniazida atravessa a barreira placentária sendo distribuída até o leite materno. Sua ligação com as proteínas plasmáticas é de aproximadamente 10-15% (BOXENBAUM & RIEGELMAN, 1974). O volume de distribuição é de 0,6 L/Kg em voluntários sadios com peso normal (BOXENBAUM & RIEGELMAN, 1974).

O processo de distribuição em acetiladores lentos e rápidos do fármaco é bimodal, devido a diferenças na atividade da N-acetiltransferase 2 (NAT-2)

(HUTCHINGS & ROUTLEDGE, 1996). A velocidade de acetilação altera significativamente as concentrações do fármaco obtidas no plasma, bem como sua meia-vida na circulação (GOODMAN & GILMAN, 2004).

O decaimento das concentrações plasmáticas da isoniazida leva ao aumento da área sob a curva (AUC) da acetilisoniazida e da diacetilhidrazina.

• Metabolismo

Existem controvérsias com relação às vias metabólicas da INH e sua relação com o mecanismo de hepatotoxicidade (HUANG et al., 2003; DAVIES, 1998; MORIKE et al., 1996; LAUTERBURG et al., 1985; NODA et al., 1983).

Uma das vias de metabolização da INH (Figura 1) envolve sua acetilação através da NAT-2 produzindo acetilisoniazida (KASHUBA et al., 1998). Esta, por sua vez, é hidrolisada formando acetilhidrazina e há, também, a formação de ácido isonicotínico, o qual é conjugado com a glicina. A acetilhidrazina pode gerar diacetilhidrazina ou hidrazina (Hz), podendo ainda ser convertida, por enzimas microssomais hepáticas, em metabólitos reativos que se presume serem responsáveis pela indução da hepatotoxicidade causada pela administração de INH. Em outra via metabólica, a INH é hidrolisada para formar Hz, com conseqüente formação de ácido isonicotínico. A hidrazina formada nas duas rotas de metabolização pode também ser convertida em metabólitos reativos supostamente hepatotóxicos, através da ação de CYP2E1 (DAVIES, 1998; ELLARD et al., 1972).

Em acetiladores rápidos, quando há aumento do metabolismo da isoniazida, a AUC da acetilhidrazina é menor, uma vez que a acetilação é preferencial para formar acetilisoniazida e diacetilhidrazina.

Com base nesta consideração, Lauterburg et al (1985) concluíram que os acetiladores lentos apresentam maior exposição à acetilhidrazina.

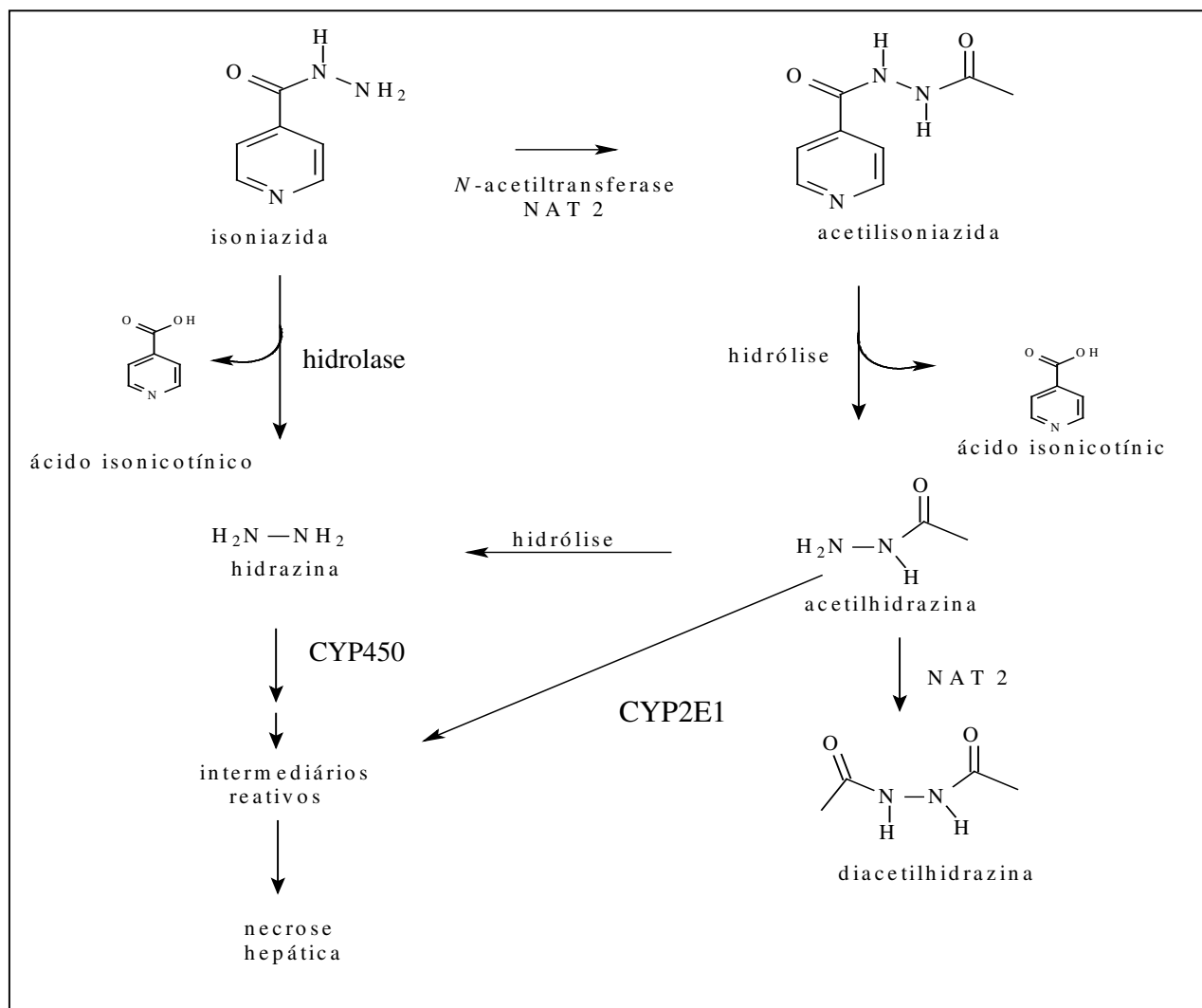


Figura 1. Metabolismo isoniazida e formação de intermediários hepatotóxicos (HUANG, 2003; DAVIES, 1998).

É importante ressaltar que o metabolismo da isoniazida é fundamentalmente dependente das reações de acetilação e hidrólise e que a população humana pode ser dividida em fenótipo acetilador rápido e lento, existindo diferenças raciais marcantes na distribuição desses fenótipos acetiladores (GOODMAN & GILMAN, 2004; DAVIES, 1998).

A incidência dos acetiladores lentos é estimada em 45 a 55% entre os americanos, 60% nos europeus, 50 a 65% em caucasianos, negros e mexicanos. A incidência de acetiladores rápidos é de 80-90% em esquimós, japoneses e chineses (MEYER et al., 1997).

Acetiladores lentos apresentam níveis séricos elevados de INH 6h após a administração de 4mg/Kg (concentração plasmática em cerca de 0,8mg/L).Em acetiladores rápidos, observa-se concentrações na ordem de 0,2mg/L , sob as mesmas condições (MEYER et al., 1997). É sugerido que acetiladores rápidos apresentam uma resposta pobre ao tratamento quando comparados aos acetiladores lentos (ELLARD, 1984).

• Excreção

Acetiladores lentos excretam significativamente mais isoniazida, acetilhidrazina e hidrazina em 24h do que acetiladores rápidos, enquanto que a excreção de acetilisoniazida e diacetilhidrazina é significativamente menor neste grupo.

A excreção através da urina em adultos com função renal normal é de aproximadamente 50-70% da dose de 5mg/Kg p.o dentro de 24h na forma inalterada da droga e na forma de metabólitos (DOUGLAS & MCLEOD, 1999). A

porcentagem de diferentes compostos excretados varia de acordo com o fenótipo acetilador. Já a excreção através do leite materno é em torno de 0,75- 2,3% da dose em 24h, isto corresponde a 6,0-20,0% da dose pediátrica terapêutica usual. Pequenas quantidades da droga são excretadas através da saliva, escarro e nas fezes (KUCERS & BENNET, 1979).

A meia vida de eliminação da isoniazida em voluntários sadios varia de 1 a 4 horas (70 minutos em acetiladores rápidos e 2 a 5 horas em acetiladores lentos) (GOODMAN & GILMAN, 2004). A meia vida plasmática pode ser prolongada para 4,3 horas em pacientes com disfunção moderada renal (PELOQUIN et al., 1997) ou insuficiência renal (BOWERSOX et al., 1973).

Segundo Lauterburg citado por Timbrell e colaboradores (1977 a) e Ellard & Gammon (1976), a meia vida plasmática da acetilhidrazina é 4,9 vezes maior que a meia vida da isoniazida (GANGADHARAM, 1986; TIMBRELL et al., 1977 a; ELLARD & GAMMON, 1976). A meia vida plasmática da diacetilhidrazina também é maior, cerca de 8 vezes que a meia vida plasmática da isoniazida (TIMBRELL et al., 1977b).

O clearance da INH é de aproximadamente 3,7 ml/min.Kg em acetiladores lentos e 7,4 ml/min.Kg em acetiladores rápidos (GOODMAN & GILMAN, 2004).

Chien et al (1997) reportam o envolvimento da INH na modulação da atividade oxidativa de CYP2E1 e suas conseqüências sobre a cinética de fármacos metabolizados por essa isoforma. Nishimura et al (2004) inferem que a isoniazida possui efeito inibitório sobre as isoformas CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19 e CYP3A alterando, da mesma forma, os parâmetros cinéticos de fármacos metabolizados por esses sistemas enzimáticos.

1.2. Rifampicina: farmacologia clínica e parâmetros farmacocinéticos

⇒ Mecanismo de ação:

A rifampicina (RMP), derivado semi-sintético da rifamicina B, atua inibindo a RNA-polimerase DNA-dependente de micobactérias e de outros microorganismos, através da formação de um complexo fármaco-enzima estável, resultando em supressão do início da formação da cadeia na síntese de RNA. São necessárias altas concentrações de rifampicina para que ela exerça sua ação bactericida sobre microorganismos intra e extracelulares. As micobactérias podem desenvolver rapidamente resistência à RMP, de modo que este antibiótico não deve ser utilizado isoladamente na quimioterapia da tuberculose (GOODMAN & GILMAN, 2004).

⇒ Farmacocinética:

• Absorção

A Rifampicina tem uma biodisponibilidade oral de 90%, sendo o estômago seu principal local de absorção (MARIAPPAN et al., 2003).

Foi encontrada uma diminuição da biodisponibilidade da RMP e seu metabólito quando esta é administrada associada a INH, o que sugere instabilidade da RMP na presença de INH no meio ácido estomacal. Sabe-se que a RMP sofre hidrólise no meio ácido e que esse processo é acelerado na presença de INH, tendo como consequência uma menor biodisponibilidade do fármaco, aumentando o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana durante o tratamento da tuberculose (SHISHOO et al., 2001).

Em concordância com estes dados, Grosset et al (1992) reportam que a administração de doses múltiplas da associação INH (25mg/Kg) + RMP (10mg/Kg) em camundongos diminui a área sob a curva da RMP, fato este que também foi observado no estudos realizados por Dickison et al (1992) durante a administração concomitante de RMP + INH + PYR + ETB.

Zwolska et al (2002) no entanto, compararam a biodisponibilidade da RMP, INH e PYR associadas em uma única cápsula com a biodisponibilidade destes três fármacos administrados separadamente e observaram que a absorção, C_p e parâmetros farmacocinéticos foram semelhantes após a administração dos fármacos livres e combinados, concluindo que esta formulação, que inclui RMP + INH + PYR poderia substituir aquelas que contém estes fármacos separados.

A administração oral de rifampicina produz concentrações plasmáticas máximas em 2 a 4 horas; após a ingestão de 600mg, este valor varia em torno de 7-12 μ g/mL (GOODMAN & GILMAN, 2004; DOUGLAS&MCLEOD,1999; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

A RMP administrada concomitantemente com o ácido aminossalicílico pode ter sua absorção retardada e assim atingir concentrações plasmáticas inadequadas para a obtenção do efeito terapêutico. Se houver necessidade da utilização destes dois fármacos, eles devem ser administrados separadamente, com intervalo de 8 à 12 horas (RADNER, 1973 apud GOODMAN & GILMAN, 2004).

- **Distribuição**

Após absorção no trato gastrointestinal, a RMP sofre rápida eliminação na bile, com conseqüente circulação entero-hepática. Durante este período há desacetilação progressiva do fármaco, de forma que, depois de 6 horas, quase todo antibiótico presente na bile encontra-se na forma desacetilada. A reabsorção intestinal é reduzida devido ao processo de desacetilação e pela presença de alimento (GOODMAN & GILMAN, 2004).

A RMP distribui-se por todo o organismo, sendo encontrada em concentrações eficazes em muitos órgãos e líquidos corporais, como LCR (líquido céfalo raquidiano) (SIPPEL et al., 1974 apud GOODMAN & GILMAN, 2004; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988). Liga-se na proporção de 80% às proteínas plasmáticas (HELSINKI, 2001). A sua extensa distribuição pode ser demonstrada pelo fato do fármaco conferir coloração laranja-avermelhada à urina, fezes, saliva, escarro, lágrimas e suor (FURESZ, 1970; FARR, 1975 apud GOODMAN & GILMAN, 2004;). O seu volume de distribuição aparente é de 1,6L/Kg.

• Metabolismo

A rifampicina sofre desacetilação hepática originando o metabólito desacetilrifampicina, o qual retém praticamente toda a atividade antibacteriana, sendo formado por desacetilação; há também formação de formilrifampicina que é resultante da hidrólise da RMP (GOODMAN & GILMAN, 2004; HELSINKI, 2001).

Este fármaco é um potente indutor das isoformas do CYP450 e de uma série de enzimas envolvidas na biotransformação de fármacos (DOUGLAS & MCLEOD, 1999). CHEN e RAYMOND (2006) verificaram em seus estudos que a administração concomitante de RMP + INH pode levar ao aumento da toxicidade

causada pela INH devido a indução dessas isoformas do CYP450, que estão relacionadas com a conversão da acetilhidrazina metabólito da INH, a compostos reativos e hepatotóxicos.

A RMP, como indutor enzimático, é capaz de intensificar a sua própria biotransformação e diminuir sua meia vida plasmática quando administrada em doses múltiplas (DOUGLAS&MCLEOD,1999).

Loss et al (1985) verificaram que após a administração de dose única, via oral, de RMP sua biodisponibilidade é de cerca de 93%, porém após doses múltiplas este valor cai para 68%, o que é explicado pelo aumento do seu metabolismo pré sistêmico.

• Excreção

A meia-vida de eliminação da RMP varia de 1,5 à 5 horas e aumenta na presença de disfunção hepática. Este parâmetro diminui progressivamente em cerca de 40% durante os primeiros 14 dias de tratamento, devido à indução de enzimas microsossomais hepáticas, com aceleração da acetilação do fármaco.

Até 30% de uma dose de RMP são excretados na urina, enquanto 60 a 65% são excretados nas fezes, sendo que menos da metade deste valor consiste no antibiótico inalterado. Pacientes com disfunção renal, não necessitam de ajuste da posologia.

O clearance da rifampicina é de 8,7 ml/min/Kg (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988). Loos et al (1985) investigaram o perfil farmacocinético da RMP e após três semanas de administração de doses múltiplas deste fármaco, observaram um aumento do clearance (5,69 vs 9,03) em seis pacientes

portadores de tuberculose e tratados com RMP, revelando que ao longo do período de terapia, há variação deste parâmetro farmacocinético por ação da própria RMP (LOOSS et al., 1985).

A rifampicina na forma inalterada e seu metabólito desacetilrifampicina, ambos farmacologicamente ativos, são excretados primariamente na bile e posteriormente na urina enquanto que o metabólito formilrifampicina tem excreção exclusivamente renal (HELSINKI, 2001).

1.3. Hepatotoxicidade induzida por drogas

O diagnóstico de dano hepático causado por drogas é freqüentemente baseado em evidências circunstanciais. A decisão pela suspensão do tratamento é feita pelo clínico que reconhece a possível relação entre o início do dano hepático com o período de introdução da terapia. A desaceleração das manifestações de dano hepático, subseqüentemente após a retirada do medicamento, evidencia a relação entre dano e o uso do fármaco. Estudos histológicos do tecido hepático permitem apenas reconhecer o tipo de dano mas não sua origem (MADDREY, 2005).

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

Causas não farmacológicas também estão associadas ao aumento da atividade sérica das transaminases (AST e ALT) como, por exemplo, a infecção por *M. tuberculosis* que causa um significativo aumento nos níveis destas enzimas devido à formação de granulomas e que pode ser erroneamente atribuída à terapia medicamentosa (LENAERTS, 2005).

A lesão hepática induzida por medicamentos pode ser equivocadamente interpretada como outra patologia hepática tais como hepatites virais agudas e crônicas ou mesmo distúrbios colestáticos crônicos, devido a semelhança da sintomatologia estabelecida (MADDREY, 2005; WALUBO et al., 1998; SARICH et al., 1995).

A combinação de aumento da atividade sérica de AST e ALT, três vezes superior ao considerado como referência e evidência clínica de icterícia, caracterizam pacientes com alto risco em desenvolver severa lesão hepática (MADREY, 2055; ATTRI et al., 2000; CASTILLO et al., 1981). Sintomas associados com dano hepático induzido por drogas usualmente são inespecíficos e incluem perda de apetite, fadiga e ocasionalmente desconforto abdominal.

Muitos compostos químicos podem produzir lesões hepáticas, seja por sua capacidade intrínseca ou por mecanismos idiossincráticos.

A produção destas lesões por capacidade intrínseca pode ocorrer de forma direta – a substância química diretamente pode produzir o dano – ou indiretamente através da produção de compostos reativos durante o seu metabolismo. (ZIMMERMAN et al., 1987).

Porém a produção do dano hepático depende da capacidade do agente e das características da exposição (THURMAN et al., 1986).

Provavelmente o fator de maior importância que determina a suscetibilidade hepática aos efeitos tóxicos das substâncias químicas é o seu relevante papel no metabolismo. Este deve gerar compostos mais hidrofílicos e, portanto, mais facilmente elimináveis pelo organismo, porém pode produzir produtos reativos que atuam sobre as células *in loco*, provocando o dano (HODGSON, 1994).

O fígado ainda está estrategicamente alocado entre o trato intestinal e a circulação sistêmica sendo através da veia porta que o fígado recebe um grande volume de sangue venoso proveniente do trato intestinal (cerca de 1,2L/min), que contém compostos resultantes da digestão e agentes toxicantes (HODGSON, 1994).

Além da sua função metabólica, o fígado exerce outros papéis importantes na manutenção da homeostase orgânica, tais como: regulação da glicemia, produção de proteínas, entre outras.

Desta forma a produção dos efeitos tóxicos sobre este tecido gera alterações profundamente perturbadoras no sistema biológico, senão fatais.

Uma série de modificações morfológicas pode caracterizar a lesão hepática consequente da ação de substâncias químicas. O tipo de alteração morfológica – citotóxica ou colestática – determina as manifestações clínicas, os defeitos funcionais e alterações bioquímicas.

A maioria dos toxicantes conduz à lesões citotóxicas (paracetamol, isoniazida, dipirona, tetraciclina, AAS, ácido valpróico, metotrexato, nifediprina) ou colestáticas (clorpromazinas, anticoncepcionais orais, fenobarbital, fenitoína, fenotiazínicos).

O metabolismo de muitas drogas resulta na formação de intermediários reativos e algumas vezes tóxicos (MADDREY, 2005; GOODMAN & GILMAN, 2004). Neste contexto, o balanço da formação de metabólitos tóxicos, pode determinar se o dano hepático vai ocorrer.

Muitos mecanismos, alguns comprovados outros sugeridos, estão envolvidos no desenvolvimento de injúria hepática. Alguns compostos químicos são hepatotoxinas detectáveis em avaliações pré-clínicas (MADDREY, 2005).

As enzimas do CYP450, amplamente relacionadas com a biotransformação de muitos fármacos, tem um importante papel na produção de intermediários reativos destas drogas, desta forma, a caracterização das espécies do CYP450 envolvidas na biotransformação de fármacos, permite prever a probabilidade de formação de intermediários reativos e avaliar o potencial de interação entre fármacos associados (MADDREY, 2005; RANG & DALE, 2003, IOANNIDES et al., 1990).

No entanto sabe-se que a família do CYP450 é dotada de polimorfismo responsável pelos diferentes fenótipos e pela variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos e metabólicos observados nas diversas populações (TUKER, 2000). Desta forma é esperado que nas diferentes populações o desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida por drogas, cujo mecanismo relaciona-se com a biotransformação do fármaco de interesse, mostre-se diferenciado.

A isoniazida é um fármaco cuja utilização tem sido relacionado ao desenvolvimento de hepatite (LEE, 2003; ATTRI et al., 2000; PEREIRA, 2000; STEELE et al., 1991; TIMBRELL et al. 1979). Diversos autores sugerem que este

efeito tóxico tem origem no metabolismo da INH (DAVIES, 1998; ELLENHORN, 1998; TIMBRELL et al., 1980).

Estudos realizados por Yue et al (2004) demonstraram que a Hz, metabólito da INH, está relacionada com a hepatotoxicidade induzida pela administração deste fármaco. Noda e colaboradores propõem que este mesmo metabólito é o precursor para a formação de compostos reativos os quais causam injúria hepática durante a terapia com INH.

Timbrell (1979), entretanto, conclui em seu estudo que a o efeito tóxico decorrente da administração de INH é causada pelo seu metabólito acetilhidrazina, produzido pela via metabólica dependente de CYP450 e que por esta via originam-se intermediários reativos os quais se ligam a proteínas hepáticas produzindo necrose.

Alguns estudos demonstram uma relação possível entre a susceptibilidade à hepatotoxicidade e o fenótipo acetilador do paciente (HUSSAIN et al., 2003; OHNO, 2000).

Se existe relação entre a acetilação da isoniazida e o efeito hepatotóxico é realmente possível que o dano hepático sofra influência genética no homem (TIMBRELL et al., 1979).

Em humanos, 2 genes NAT-1 e NAT-2 são responsáveis pela atividade da acetiltransferase e recentes estudos têm revelado a existência de alelos variantes de ambos. Este fato sugere que algumas destas variantes modificam a susceptibilidade individual à doença (PANDE et al., 2003; MEYER & ZANGER, 1997).

Considerando a existência de marcantes diferenças raciais na distribuição do fenótipo acetilador, é razoável a expectativa de que a susceptibilidade aos efeitos hepatotóxicos induzidos pela isoniazida sofra interferência da etnia.

Em estudo realizado com orientais foi encontrada maior susceptibilidade à hepatotoxicidade do que para negros ou brancos americano. Estudos retrospectivos com ocidentais mostraram maior incidência de hepatotoxicidade em acetiladores rápidos (TIMBRELL et al., 1979). Entretanto, outros estudos demonstram maior incidência de hepatotoxicidade em acetiladores lentos (HUANG et al, 2003; OHNO et al., 2000; PERETTI et al., 1987; LAUTERBURG et al., 1985). Autores, ainda, têm relatado que não existe relação entre o fenótipo acetilador e a hepatotoxicidade induzida pela acetilisoniazida (DAVIES, 1998).

Peretti e colaboradores (1987) concluem em seu trabalho que acetiladores lentos são mais susceptíveis a danos hepáticos que os acetiladores rápidos e, ainda, que a utilização de apresentações de liberação lenta de INH não promove saturação da taxa de acetilação ou diferenças na formação de metabólitos acetilados.

É importante ressaltar que a avaliação dessa relação deve considerar aspectos como a utilização simultânea de drogas no estudo, o regime terapêutico adotado e os níveis estabelecidos como valores de referência para as transaminases, que são utilizadas como parâmetros no diagnóstico das lesões hepáticas.

Acetiladores rápidos promovem maior formação de acetilisoniazida que originará, por hidrólise, o ácido isonicotínico e acetilhidrazina. Os acetiladores lentos promovem preferencialmente a hidrólise da isoniazida com formação de

ácido isonicotínico e hidrazina (TIMBRELL et al.,1979). Segundo Huang e colaboradores (2003), a oxidação da acetilhidrazina, intermediada pela isoforma CYP2E1, resulta na formação de compostos hepatotóxicos do metabolismo da INH.

Em seu trabalho, Lauterburg conclui que quando uma grande dose de isoniazida é administrada ocorre saturação do processo de acetilação. Essa saturação pode contribuir, especialmente nos acetiladores lentos, para o acúmulo de acetilhidrazina e, portanto, aumentar o risco de dano hepático. Porém os autores ressaltam que o fenótipo é somente mais um fator de risco para o dano hepático (LAUTERBURG et al., 1985).

Utilizando técnicas de genotipagem e fenotipagem, Huang e colaboradores (2003) evidenciaram que indivíduos homozigotos e com maior atividade oxidativa de CYP2E1 apresentam maior susceptibilidade aos efeitos hepatotóxicos da isoniazida, especialmente os acetiladores lentos (HUANG et al., 2003). Desta forma, encontramos novo fator interveniente para o efeito hepatotóxico: a via oxidativa do metabolismo da isoniazida.

A susceptibilidade à hepatotoxicidade dos acetiladores lentos pode ser explicada pelo fato de que a oxidação ocorre mais efetivamente nesse grupo de indivíduos, dado que há maior disponibilidade de acetilhidrazina para a reação.

Assim, Huang et al (2003) sugerem que a susceptibilidade à hepatotoxicidade induzida pela administração da isoniazida é dependente não somente do fenótipo acetilador do paciente, mas também do fenótipo oxidativo referente a CYP2E1.

Então, existem evidências de que a atuação de enzimas microssomais sobre a acetilhidrazina e hidrazina seja responsável pela ação hepatotóxica. No entanto, existem outros fatores envolvidos no efeito hepatotóxico tais como: atividade das enzimas microssomais relacionadas aos genótipos, fenótipo acetilador e saturação do processo metabólico resultante do regime de dose, assim como a interação entre medicamentos associados ao tratamento da tuberculose (HUANG et al., 2003; TIMBRELL et al., 1979).

Diante do exposto, é possível afirmar que existem muitas evidências de que a hepatotoxicidade induzida pela INH está relacionada com seu metabolismo. No entanto, os estudos até então realizados apresentam conclusões controversas e apontam a necessidade da realização de novas pesquisas voltadas à elucidação de sua patogênese.

2. JUSTIFICATIVA

No tratamento da tuberculose, principal aplicação terapêutica da isoniazida é utilizada a associação rifampicina e pirazinamida, o que pode resultar em modificações no perfil farmacocinético da isoniazida com conseqüências sobre a taxa de formação dos seus metabólitos.

O presente trabalho tem como finalidade avaliar o perfil farmacocinético da isoniazida quando administrada isoladamente e na associação com RMP procurando evidências de interações farmacocinéticas e suas conseqüências sobre a taxa de formação dos metabólitos da INH, uma vez que existem indícios de que a hepatotoxicidade, induzida por este medicamento esta relacionada ao seu metabolismo.

3. OBJETIVOS

- ⇒ Desenvolver, padronizar e validar um método analítico para a determinação simultânea da INH e seus metabólitos AcINH, Hz e AcHz;
- ⇒ Investigar a disposição cinética da isoniazida e seus metabólitos em animais tratados com doses múltiplas de INH (100mg/Kg/dia), por gavagem, por 21 dias e analisar os parâmetros bioquímicos relacionados a possíveis alterações hepáticas (AST e ALT) ocorridas durante o período de administração da INH;
- ⇒ Investigar a disposição cinética da INH e seus metabólitos em animais tratados com doses múltiplas da associação INH (100mg/kg/dia), e rifampicina (100mg/Kg/dia), por gavagem, por 21 dias e analisar os parâmetros bioquímicos relacionados a possíveis alterações hepáticas (AST e ALT) ocorridas durante o período de administração destes fármacos;
- ⇒ Investigar possíveis alterações hepáticas (AST e ALT) em animais tratados com doses múltiplas de RMP (100mg/Kg/dia), por gavagem, por um período de 21 dias;
- ⇒ Comparar os parâmetros farmacocinéticos e bioquímicos obtidos em cada grupo.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística:

Foram utilizados ratos Wistar, com peso médio em torno de 250g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Farmácia Bioquímica da Unesp de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 07h); com disponibilidade de alimento e água à vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro. Foram utilizados um total de 140 animais distribuídos nos seguintes grupos: Grupo I - animais tratados com água estéril ($n = 20$); Grupo II - animais tratados com isoniazida ($n = 50$), Grupo III - animais tratados com rifampicina ($n = 20$) e Grupo IV- animais tratados com isoniazida e rifampicina ($n = 50$). Optou-se pela administração por gavagem pois a via oral é utilizada para o tratamento da tuberculose aplicado em humanos.

Todos os fármacos foram administrados na forma de suspensão, tendo sido água estéril o veículo utilizado. As suspensões foram preparadas diariamente e administradas sempre às oito horas da manhã, com um volume de no máximo 1ml, variando de acordo com o peso de cada animal tratado.

Os fármacos INH e RMP foram, gentilmente, cedidos pela Fundação do Remédio Popular (FURP).

4.2. Protocolo experimental:

a)- Grupo I (água estéril):

Para os animais deste grupo foi administrada somente água estéril por gavagem, diariamente, por um período de 21 dias.

Previamente ao tratamento, amostras de sangue dos animais foram coletadas para o estudo da atividade das enzimas ALT e AST (dia zero).

Foi realizada a determinação da atividade das transaminases nos tempos zero (anteriormente ao início da administração de água estéril) e no vigésimo primeiro dia de experimento (a partir do início da administração de água estéril), sendo que a primeira coleta foi feita na cauda do animal e a segunda amostra foi obtida a partir da decapitação dos animais.

As amostras de sangue coletadas da cauda dos animais e a partir da decapitação dos mesmos foram colhidas, respectivamente, em eppendorf e em tubos apropriados para a obtenção de soro. O sangue foi então centrifugado a 2500rpm e o soro obtido de cada animal foi utilizado para a realização das análises laboratoriais.

O objetivo da inclusão desse grupo no presente trabalho foi verificar possíveis alterações das transaminases em animais submetidos ao estresse da administração diária por gavagem e alterações dos níveis destas enzimas decorrentes do desenvolvimento do animal, considerando que a exposição é relativamente prolongada (21 dias).

b)- Grupo II (isoniazida):

Os animais deste grupo receberam diariamente uma dose de 100mg/Kg de isoniazida por gavagem, por um período de 21 dias. A dose utilizada neste experimento foi baseada no trabalho realizado por Yue e colaboradores (2004), possibilitando a comparação entre os resultados obtidos nos dois estudos.

O sangue destes animais foi coletado nos tempos zero (anteriormente ao início da administração de isoniazida) e no vigésimo primeiro dia de experimento (a partir do início da administração do fármaco), sendo que a primeira coleta foi feita na cauda dos animais e a segunda amostra foi obtida por decapitação. As amostras de sangue obtidas pela cauda foram utilizadas para a determinação da atividade das transaminases pré tratamento. A determinação da isoniazida e metabólitos foi realizada no material biológico obtido por decapitação das cobaias, após 21 dias de tratamento. A cinética da isoniazida e de seus metabólitos foi investigada com base na relação *concentração plasmática x tempo*. Foram coletadas amostras de sangue em 10 tempos diferentes (0; 15'; 30'; 45'; 60'; 1,5h; 3h; 6h; 12h; e 24h). Para cada tempo de coleta foram empregados 5 ratos (5 replicatas).

As amostras de sangue coletadas da cauda dos animais por decapitação foram colhidas, respectivamente, em eppendorf e em tubos apropriados para a obtenção de soro. O sangue foi então centrifugado a 2500rpm por 10 min e o soro obtido de cada animal foi utilizado para a realização das análises laboratoriais.

Neste grupo foram obtidas as informações dos parâmetros farmacocinéticos da isoniazida administrada isoladamente e o perfil farmacocinético de seus metabólitos assim como os parâmetros bioquímicos (AST e ALT) marcadores de hepatotoxicidade.

c)- Grupo III (rifampicina):

Os animais deste grupo receberam diariamente uma dose de 100mg/Kg de rifampicina por gavagem, durante 21 dias.

O sangue destes animais foi coletado nos tempos zero (anteriormente ao início da administração de rifampicina) e no vigésimo primeiro dia de experimento (a partir do início da administração do fármaco), sendo que a primeira coleta foi feita pela cauda e a segunda amostra foi obtida a partir da decapitação dos animais. As amostras de sangue foram utilizadas para a determinação da atividade enzimática de AST e ALT.

As amostras de sangue coletadas da cauda dos animais e por decapitação foram colhidas, respectivamente, em eppendorf e em tubos apropriados para a obtenção de soro. O sangue foi então centrifugado a 2500rpm por 10 min e o soro obtido de cada animal foi utilizado para a realização das análises laboratoriais.

Neste grupo obtivemos as informações relacionadas ao desenvolvimento de dano hepático na exposição a doses múltiplas de rifampicina administrada isoladamente.

A dose de rifampicina administrada foi selecionada com base na proporção INH:RMP utilizada no tratamento da tuberculose.

d)- Grupo IV (isoniazida associada à rifampicina):

Os animais foram tratados com doses diárias de isoniazida (100mg/Kg) e rifampicina (100mg/Kg) por gavagem, durante 21 dias. A dose utilizada neste

experimento foi baseada no trabalho realizado por Yue e colaboradores (2004), possibilitando a comparação entre os resultados obtidos nos dois estudos.

O sangue destes animais foi coletado nos tempos zero (anteriormente ao início da administração de isoniazida e rifampicina) e no vigésimo primeiro dia de experimento (a partir do início da administração dos fármacos), sendo que a primeira coleta foi feita pela cauda e a segunda amostra foi obtida a partir da decapitação dos animais. O material foi utilizado para a determinação sérica da atividade enzimática de AST e ALT. A determinação sérica da isoniazida foi realizada a partir do material biológico coletado por decapitação. A cinética da isoniazida e de seus metabólitos foi investigada com base na relação *concentração plasmática x tempo*. Foram coletadas amostras de sangue em 10 tempos diferentes (0; 15'; 30'; 45'; 60'; 1,5h; 3h; 6h; 12h; e 24h). Para cada tempo de coleta foram empregados 5 ratos (5 replicatas).

As amostras de sangue coletadas da cauda dos animais e por decapitação foram colhidas, respectivamente, em eppendorff e em tubos apropriados para a obtenção de soro. O sangue foi então centrifugado a 2500rpm por 10 min e o soro obtido de cada animal foi utilizado para a realização das análises laboratoriais.

Neste grupo foram obtidos os parâmetros farmacocinéticos da isoniazida administrada concomitantemente com rifampicina assim como os parâmetros marcadores de hepatotoxicidade dessa associação.

4.3. Métodos Analíticos

A análise de isoniazida e de seus metabólitos em amostras de soro foi realizada através da utilização da técnica de HPLC e baseado no método desenvolvido por Seifart e colaboradores (1995), com pequenas modificações.

4.3.1. Reagentes

Padrões de isoniazida 99% (Sigma); hidrazina monohidratada 99% e acetilhidrazina 95% (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA); acetilisoniazida foi sintetizada e purificada pelo laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara; fosfato de potássio monobásico e o ácido tricloroacético provenientes da Labsynth (São Paulo, Brasil) e cinamaldeído Merck (Alemanha). Os solventes acetonitrila e isopropanol empregados na fase móvel do sistema cromatográfico foram obtidos da J. T. Baker (USA), grau HPLC. Para a determinação da atividade sérica das transaminases foi utilizado Kit Labtest (CAT: 52 - 200 e 53 - 200 para AST e ALT, respectivamente).

Foram preparadas soluções (em água estéril) estoque de INH e AcINH (5000 µg/mL), e de Hz e AcHz (80 µg/mL), em água, utilizadas para todo o processo de validação.

4.3.2. Sistema Cromatográfico

Foi utilizado o sistema de cromatografia líquida (HPLC) Waters Alliance equipado com detector UV-VS 2487, operando a 340 nm, coluna Resolve TM C₁₈ (5µm, 90 A, 3,9mm x 300mm) com injetor automático. A fase móvel foi constituída

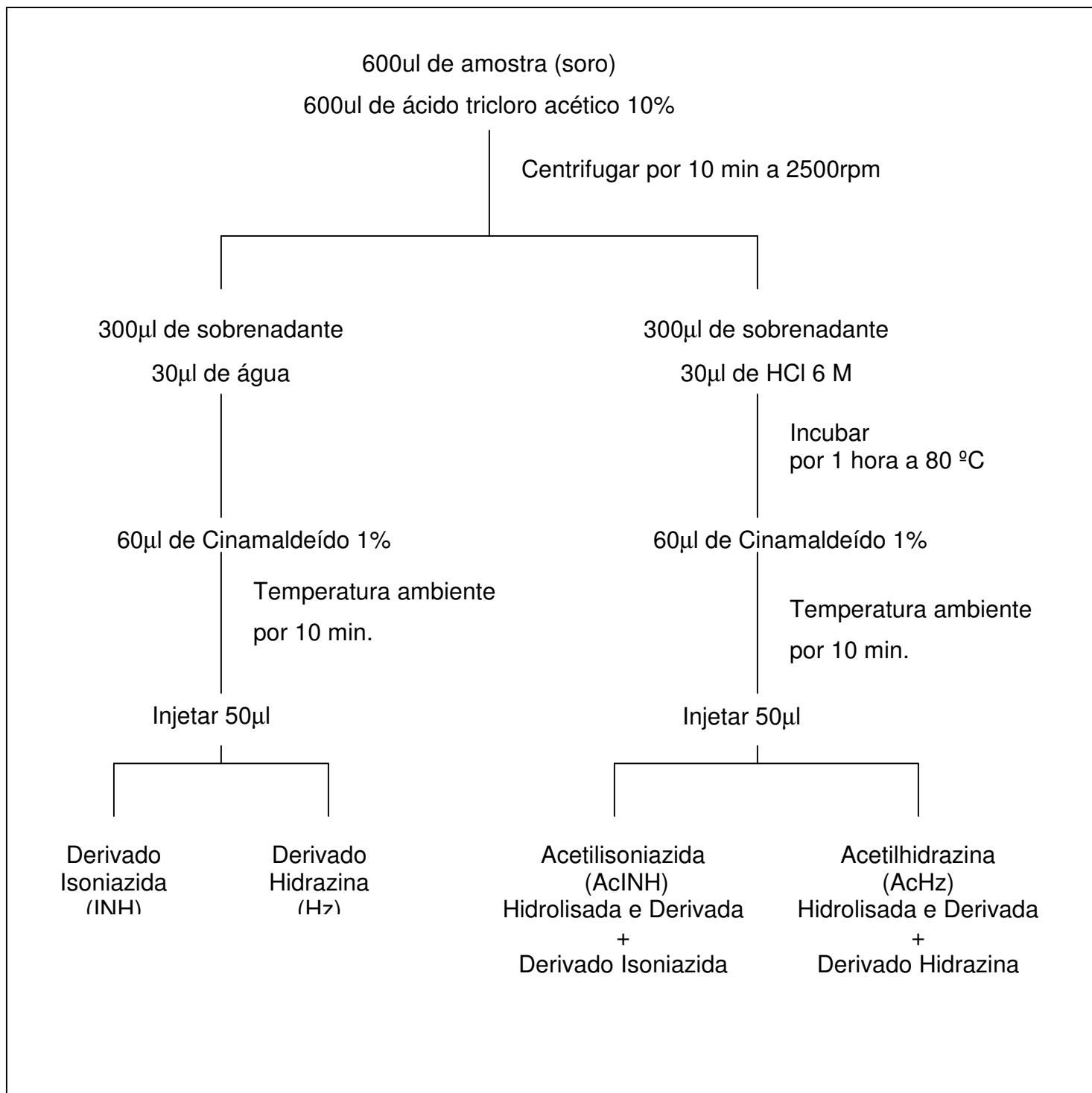
dos solventes isopropanol (A), acetonitrila (B) e tampão fosfato de potássio monobásico 0,05M (C) em modo gradiente com início e término da análise nas proporções de 8% de A; 32% de B e 60% de C (**Tabela 1**), com fluxo de 1mL/min.

Tabela 1. Fase móvel do sistema cromatográfico em modo gradiente.

Tempo (min)	Solventes		
	Isopropanol (A)	Acetonitrila (B)	Tampão fosfato (C)
0	8	32	60
1	8	32	60
10	14	56	30
15	14	56	30
16	8	32	60
18	8	32	60
23	8	32	60

4.3.4. Procedimento Analítico para a determinação de INH e metabólitos

O procedimento para a análise em soro (**Fuxograma 1**) envolveu a precipitação de proteínas do soro através da adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (em água) e formação de derivados com cinamaldeído (CA) a 1% (em metanol).



Fluxograma I – procedimento para a determinação de isoniazida e metabólitos em soro (Seifart e colaboradores, 1995).

4.3.5. Preparação das amostras para determinação de isoniazida e metabólitos em soro

⇒ Derivatização

As amostras de sangue dos animais, obtidas por decapitação após o 21^o dia de tratamento, foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos para obtenção de soro.

Para cada 600 ul de soro foram adicionados 600 ul de TCA (10%), para a deproteinização das amostras. Os tubos foram agitados em vortex e depois centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi separado em duas alíquotas, uma (300 ul) destinada a obtenção dos derivados de INH e Hz, e outra (300 ul) utilizada para a hidrólise (com HCl 6M - incubação de 1h a 80°) da AcINH e AcHz, resultando em INH e Hz, respectivamente, a partir das quais são obtidos os seus derivados. Aos 300 ul de sobrenadante foram adicionados 30 ul de água (ou 30 ul de HCl 6M) e 60 ul de CA (1%); os tubos foram agitados e deixados 10 minutos a temperatura ambiente (para a obtenção dos derivados de INH e Hz), sendo posteriormente centrifugados a 2800 rpm por 5 minutos. Alíquotas do sobrenadante (50 ul) foram injetadas no sistema cromatográfico empregado para análise de derivados da INH e da Hz.

4.3.6. Curvas de calibração

As curvas de calibração foram construídas utilizando-se soro humano, pois não houve diferenças significativas entre os cromatogramas obtidos a partir da

análise de soro humano e de soro de rato contaminadas com soluções de INH e metabólitos, analisadas nas mesmas concentrações.

4.3.6.1. Curva de calibração da isoniazida (INH)

Alíquotas de soro coletadas de diferentes voluntários (n=6) foram inicialmente testadas para a verificação de picos interferentes no tempo de retenção próximo ao do derivado de INH.

Alíquotas de 0,990mL de plasma , em triplicata, foram enriquecidas com 10 µL de cada solução diluída de INH (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 37,5 e 50ug por mL de soro) e derivadas conforme descrito anteriormente. Foram construídas duas curvas para INH, uma na presença e outra na ausência de hidrólise, por haver perda deste composto durante o processo de hidrólise com HCl, o qual é empregado para a análise dos derivados acetilados.

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicadas injetadas) do pico do derivado de INH e no eixo das abcissas as concentrações (**C**) de isoniazida (ug/ml).

4.3.6.2. Curva de calibração da hidrazina (Hz)

Alíquotas de soro coletadas de diferentes voluntários (n=6) foram inicialmente testadas para a verificação de picos interferentes no tempo de retenção próximo ao do derivado de Hz.

Alíquotas de 0,990mL de plasma , em triplicata, foram enriquecidas com 10 µL de cada solução diluída de Hz (50; 100; 150; 200; 300 e 400 ng por mL de soro) e derivadas conforme descrito anteriormente.

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicadas injetadas) do pico do derivado de Hz e no eixo das abcissas as concentrações (**C**) de hidrazina (ng/ml).

4.3.6.3. Curva de calibração da acetilisoniazida (AcINH)

Alíquotas de soro coletadas de diferentes voluntários (n=6) foram inicialmente testadas para a verificação de picos interferentes no tempo de retenção próximo ao do derivado de INH.

Alíquotas de 0,990mL de plasma, em triplicata, foram enriquecidas com 10 μ L de cada solução diluída de AcINH (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 37,5 e 50ug por mL de soro) e derivadas conforme descrito anteriormente. Para a construção desta curva de calibração considerou-se a equimolaridade entre a INH e a AcINH, que é de 1,3065.

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicadas injetadas) do pico do derivado de INH e no eixo das abcissas as concentrações (**C**) de acetilisoniazida (ug/ml).

⇒ Calculo para quantificação de AcINH

Para a quantificação da AcINH presente nas amostras foi necessário considerarmos que este metabólito foi quantificado indiretamente pelo método analítico empregado, através da formação de INH. Como descrito no item 4.3.5, uma alíquota de cada amostra foi submetida a processo de hidrólise com HCl 6M resultando na formação de INH proveniente da desacetilação da AcINH. Esta

amostra hidrolisada continha então INH decorrente da administração deste fármaco e INH resultante da hidrólise da AcINH.

O cálculos para a determinação da concentração de AcINH foi realizado utilizando-se uma equação através da qual subtraímos do valor total de INH a concentração desta advinda de sua administração, para tal submetemos a concentração real de INH a sua curva de calibração construída na presença de hidrólise.

Para os cálculos também foi considerado a equimolaridade entre INH e AcINH que é de 1,3065.

A equação abaixo foi utilizada para os cálculos da concentração de AcINH presente nas amostras analisadas:

$$\text{Conc. AcINH} = \{[\text{Área dAcINH} - (\text{Conc. INH} \times 308018,62 + 36753,59)] - 253826,09\} / 207103,54 \times 1,3065$$

Legenda:

- **Conc. AcINH:** concentração de AcINH presente na amostra;
- **Área dAcINH:** área referente ao derivado de INH provenientes da hidrólise da AcINH e da INH pré-existente na amostra;
- **Valores em azul:** pertencem a curva de calibração da INH construída após processo de hidrólise;
- **Valores em lisás:** pertencem a curva de calibração da AcINH.

4.3.6.4. Curva de calibração da acetilhidrazina (AcHz)

Alíquotas de soro coletadas de diferentes voluntários (n=6) foram inicialmente testadas para a verificação de picos interferentes no tempo de retenção próximo ao do derivado de Hz.

Alíquotas de 0,990mL de plasma, em triplicata, foram enriquecidas com 10 µL de cada solução diluída de AcHz (70; 100; 150; 200; 300 e 400ng por mL de soro) e derivadas conforme descrito anteriormente. Para a construção desta curva de calibração considerou-se a equimolaridade entre a Hz e a AcHz, que é de 2,3118.

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicatas injetadas) do pico do derivado de INH e no eixo das abcissas as concentrações (**C**) de acetilisoniazida (ug/ml).

⇒ **Calculo para quantificação de AcHz**

Para a quantificação da AcHz presente nas amostras foi necessário considerarmos que este metabólito foi quantificado indiretamente pelo método analítico empregado. Como descrito no item 4.3.5, uma alíquota de cada amostra foi submetida a processo de hidrólise com HCl 6M resultando na formação de Hz proveniente da desacetilação da AcHz. Esta amostra hidrolisada continha então Hz decorrente da metabolização de INH e Hz resultante da hidrólise da AcHz.

Para o calculo de AcHz subtraímos do valor total de Hz a concentração desta resultante do metabolismo da INH.

Os cálculos também consideraram a equimolaridade entre a Hz e a AcHz que é de 2,3118.

A equação abaixo foi utilizada para os cálculos da concentração de AcHz presentes nas amostras:

$$\text{Conc. AcHz} = \left[\frac{(\text{Área dAcHz} + 6820,4)}{1316,6} - \text{Conc. Hz} \right] \times 2,3118$$

Legenda:

- **Conc. AcHz:** concentração de AcHz presente na amostra;
- **Conc. Hz:** concentração de Hz presente na amostra;
- **Área dAcHz:** área referente ao derivado de Hz provenientes da hidrólise da AcHz e da Hz pré-existente na amostra;
- **Valores em azul:** pertencem a curva de calibração da AcHz.

4.3.7. Validação do método analítico

A validação do método foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA e incluiu os procedimentos necessários para avaliar se o método analítico desenvolvido é adequado para a aplicação em estudos de farmacocinética.

4.3.7.1. Linearidade

A linearidade foi estudada através da análise de amostras de soro adicionadas de concentrações maiores de isoniazida, acetilisoniazida, hidrazina e acetilhidrazina do que aquelas utilizadas na construção das respectivas curvas de calibração. O método foi considerado linear até a maior concentração analisada,

cujas replicatas apresentaram coeficiente de variação <15%. Foram analisadas, em triplicata, amostras com concentrações de 0,078 a 75ug/ml para INH e AcINH e concentrações de 25 a 800ng/ml para Hz e AcHz.

4.3.7.2. Limite de Detecção

O limite de detecção foi determinado através da aplicação do método de derivação (descrito anteriormente) por meio da análise de amostras de soro adicionadas de alíquotas de soluções, de diferentes concentrações, de INH e metabólitos e considerado como sendo a menor concentração determinável (área média 3x maior que área do branco da amostra) de INH, AcINH, Hz e AcHz, com coeficiente de variação (CV) menor que 20%. As amostras foram analisadas em triplicata.

4.3.7.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado através da aplicação do método de derivação (descrito anteriormente) por meio da análise de amostras de soro adicionadas de alíquotas de soluções, de diferentes concentrações, de INH e metabólitos e considerado como sendo a menor concentração quantificável (área média 5x maior que a área do branco da amostra) de INH, AcINH, Hz e AcHz, com coeficiente de variação (CV) menor que 20%. As referentes amostras foram analisadas em triplicata.

4.3.7.4. Precisão e exatidão intra e inter ensaios

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de soro adicionados de três concentrações diferentes de isoniazida e seus metabólitos, durante 5 dias consecutivos (inter ensaios) e em 10 replicatas em um mesmo ensaio (intra-ensaio). Para os estudos de precisão da INH e AcINH, as concentrações utilizadas foram de 1; 10 e 40ug/ml para a INH e de 5; 15 e 30ug/ml para AcINH, enquanto que para os estudos da Hz, as concentrações foram de 75; 150 e 300ng/ml e para AcHz, as concentrações foram de 100; 200 e 300ng/ml. A exatidão (% erro sistemático) foi obtida através da avaliação da concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores reais da isoniazida e de seus metabólitos.

4.3.7.5. Seletividade

A interferência de outros fármacos no método foi avaliada através da injeção de soluções padrão em concentrações similares àsquelas observadas no soro quando administrados na dose terapêutica, e os tempos de retenção comparados com os dos derivados de INH e Hz nas condições cromatográficas estabelecidas. Foram testados os seguintes fármacos: rifampicina, etambutol, pirazinamida, ácido acetil salicílico, cafeína, ranitidina, loratadina e alopurinol. Foram selecionados estes fármacos por serem rotineiramente empregados contra os efeitos adversos resultantes do tratamento da tuberculose.

4.3.7.6. Estabilidade

O ensaio de estabilidade tem como finalidade avaliar se a concentração do analito sofre alterações após um período específico de armazenamento pré-processamento laboratorial (CHANG, 2002). Neste estudo foi avaliada a estabilidade de curta e média duração. A estabilidade de curta duração foi determinada após 3 ciclos de congelamento e descongelamento (tempos 0; 1 e 2 dias) aplicados a alíquotas de três concentrações (alta, média e baixa) de INH e de seus metabólitos: para INH e AcINH as concentrações utilizadas no estudo foram de 1; 10 e 40ug/ml, enquanto que para Hz e AcHz, as concentrações foram de 40; 150 e 300ng/ml. A estabilidade de média duração foi determinada após 6 ciclos de congelamento e descongelamento (tempos 0; 1; 2; 4; 8 e 21 dias), aplicados a alíquotas de três concentrações (alta, média e baixa) de INH e metabólitos (mesmas concentrações empregadas nos estudos de curta duração). Cada ciclo (para ambos os estudos) envolveu o congelamento das amostras, adicionadas de padrões, a -20°C por 12 horas, seguido de períodos de descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram processadas (derivação, como descrito no item 4.3.4) e analisadas, sendo então re-congeladas nas mesmas condições.

Foram avaliadas para cada modalidade de estabilidade 05 amostras de cada concentração estudada de INH e metabólitos.

4.4. Análise Farmacocinética

A disposição cinética da isoniazida, acetilisoniazida, hidrazina e acetilhidrazina foi avaliada no estado de equilíbrio.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas concentração plasmática *versus* tempo.

As meias vidas e as constantes de velocidade (absorção, distribuição e eliminação) foram determinadas com base no modelo bicompartimental, que foi o que melhor se adaptou aos dados experimentais.

As constantes de velocidade foram calculadas através da equação $0.693/t_{1/2}$. As áreas sob as curvas concentração plasmática *versus* tempo (AUC^{0-24}) foram calculadas através do método dos trapezóides. Para a isoniazida, AUC foi utilizada nos cálculos de *clearance* total aparente ($Cl/f = \text{dose}/AUC$), volume aparente de distribuição ($Vd/f = Cl/f/\beta$) e concentração plasmática no estado de equilíbrio ($C_{pss} = AUC/\tau$) (BAUER, 2001; BOROUJERDI, 2001; BRETT et al., 2003; GIBALDI, 1991;)

Foram analisadas as relações: AUC_{Hz}/AUC_{INH} ; AUC_{AcINH}/AUC_{INH} ; AUC_{AcHz}/AUC_{AcINH} e AUC_{Hz}/AUC_{AcHz} em cada grupo, verificando-se assim possíveis diferenças na formação dos metabólitos de isoniazida em cada grupo estudado.

Parâmetro	Método para obtenção
AUC^{ss}₀₋₂₄ (ug.h.mL⁻¹)	Trapezóides
t_{1/2} α (h)	Resíduos
K_a (h⁻¹)	0,693/ t _{1/2} ^a
t_{1/2} α (h)	Resíduos
K_α (h⁻¹)	0,693/ t _{1/2} ^α
t_{1/2} β (h)	Gráfico
β (h⁻¹)	0,693/ t _{1/2}
Vd/ f (L)	Cl/f/β
Cl_T/ f (L.h⁻¹)	Dose/AUC
Cpss	ASC/τ

4.5. Determinação da atividade enzimática de AST e ALT

As determinações de ALT e AST foram realizadas por método colorimétrico pela reação de Reitman Frankel (BURTIS & ASHWOOD, 2001) (Kit Labtest).

As etapas envolvidas na determinação das transaminases estão descritas abaixo:

⇒ Aspartato Aminotransferases (AST ou TGO)- método colorimétrico - a reação de AST resulta na formação de oxalacetato, que é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensa cor em meio alcalino (Kit Reagente Labtest) (CAT: 52 - 200).

⇒ Alanina Aminotransferase (ALT ou TGP)- método colorimétrico - a reação de ALT resulta na formação de piruvato, que é medido através da formação de

hidrazona, a qual tem intensa cor em meio alcalino (Kit Reagente Labtest) (CAT: 53 - 200).

4.6. Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através das médias e desvio padrão da média (EPM). A comparação dos parâmetros farmacocinéticos para isoniazida e seus metabólitos e a taxa de formação de metabólitos foram comparados através da aplicação do teste *t*-student para os dados paramétricos e teste de Mann-whitney para os dados não paramétricos. Os parâmetros bioquímicos foram comparados pelo teste Dunn`s.

Foram empregados os programas SigmaStat e GraphPad Instat®. Os cálculos das curvas de calibração e coeficiente de variação (CV%) foram realizados através do programa Origin®.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação de INH e metabólitos

A determinação de isoniazida e de seus metabólitos hidrazina, acetilisoniazida e acetilhidrazina, através de processo de derivatização com cinamaldeído, resultou na formação de derivados de INH e Hz, separados em coluna de fase reversa C18 e detectados por UV ($\lambda = 340\text{nm}$) (Figura 2A e 2B).

As alíquotas de soro utilizadas na validação do método não apresentaram picos nos mesmos tempos de retenção dos derivados de INH e Hz (cromatograma pool de soro / branco – Figura 3).

Os fármacos selecionados para o estudo de seletividade não apresentaram picos na região de interesse (tempo 0-30min) (Tabela 2).

As curvas de calibração em soro foram construídas no intervalo de: 0,78 a 50ug/ml para INH ($R = 0,99993$); 0,78 a 50ug/ml para AcINH ($R = 0,99997$); 0,05 a 0,4ug/ml para Hz ($R = 0,99828$) e de 0,07 a 0,4ug/ml para AcHz, ($R = 0,99994$). Considerando a perda de isoniazida durante o processo de hidrólise com HCl 6 M, construiu-se uma curva de calibração para a isoniazida após a mesma ser submetida a hidrólise ($R = 0,99999$) (Figuras 4A, 4B, 5, 6 e 7).

Os limites de detecção (LD) foram de 0,05ug/ml para INH; 0,025ug/ml para Hz; 0,07ug/ml para AcINH e de 0,036ug/ml para AcHz (Tabela 3).

Os limites de quantificação para a dosagem de INH, acetilisoniazida, hidrazina e acetilhidrazina em soro foram definidos em 0,07ug/ml, 0,100ug/ml; 0,41ug/ml e 0,06ug/ml, respectivamente (Tabela 3).

O método foi considerado linear até a concentração de 75ug/ml de INH e AcINH e até a concentração de 0,8ug de Hz e AcHz por mL de soro (Tabela 3).

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão intra-ensaio e inter-ensaios em soro foram inferiores a 15%, conforme demonstrados na Tabela 4.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de estabilidade de curta e média duração dos compostos foram inferiores a 15% para INH, Hz e AcHz e superiores a este valor para AcINH (Tabela 5).

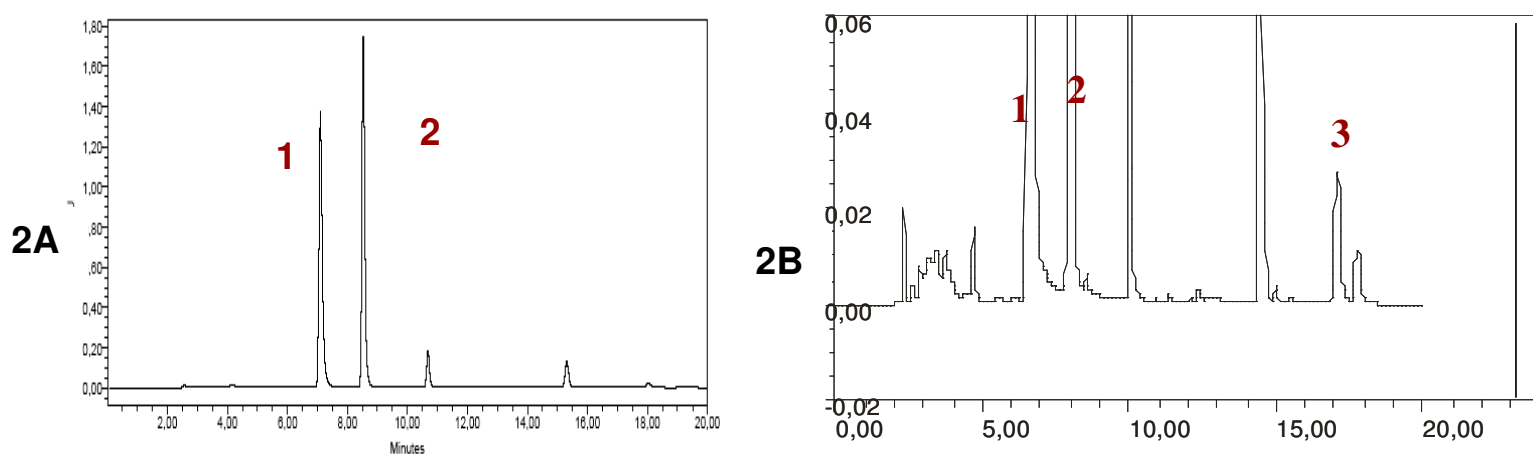


Figura 2A e 2B. Cromatogramas referentes à análise de isoniazida e hidrazina em soro: pico 1 derivado de isoniazida; pico 2 cinamaldeído em excesso; pico 3 derivado de hidrazina. Correspondem ao mesmo cromatograma, porém em escalas diferentes. As figuras correspondem ao mesmo cromatograma, porém exposto em diferentes escalas.

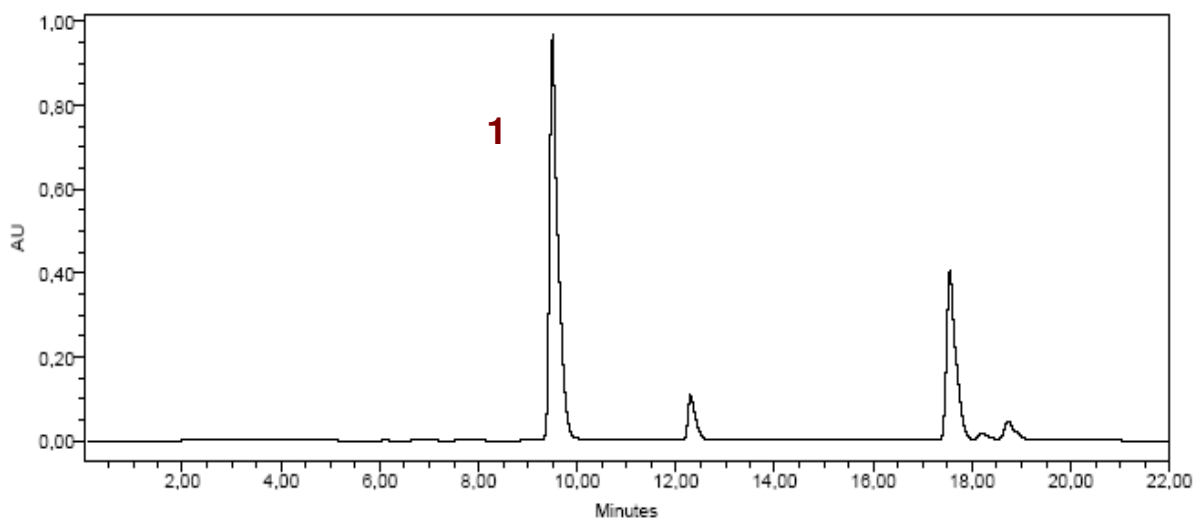
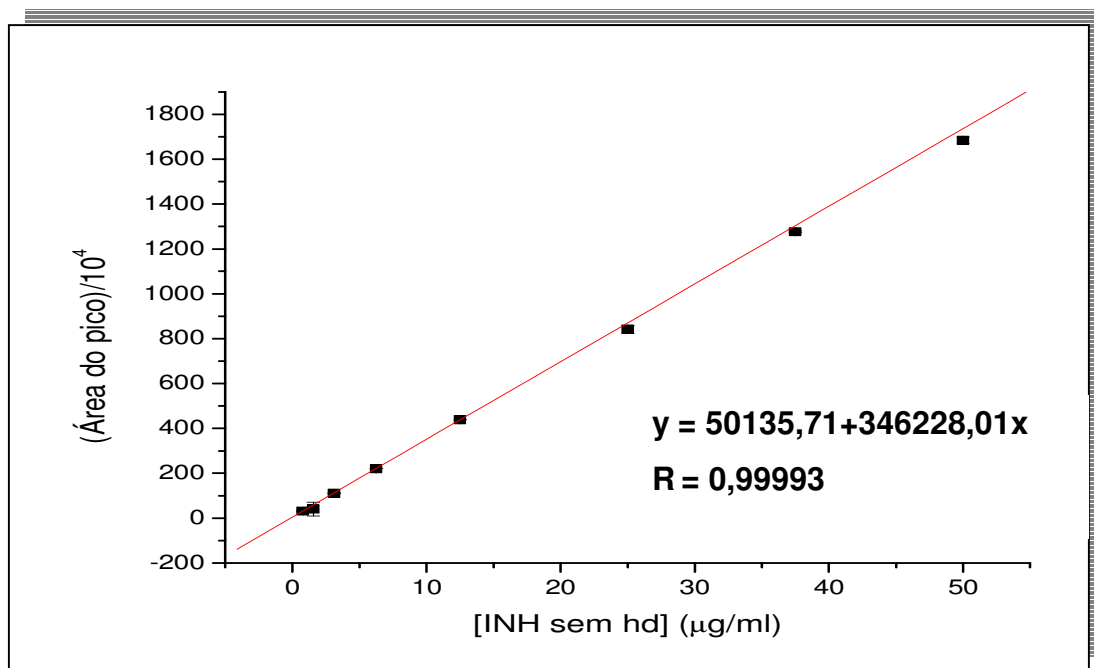
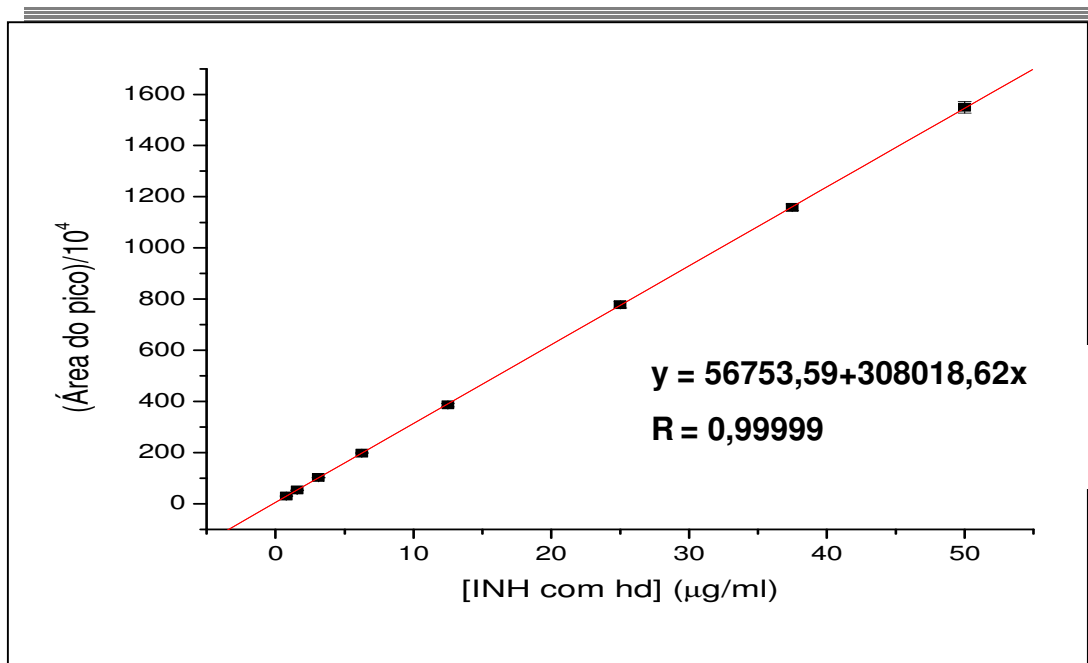


Figura 3. Cromatograma referente ao branco do soro utilizado para a construção das curvas de calibração. Pico **1** excesso de cinamaldeído.

4-A



4-B



Figuras 4A e 4B. Curvas de calibração em soro para INH sem hidrólise (2A) e após procedimento com hidrólise (2B).

5

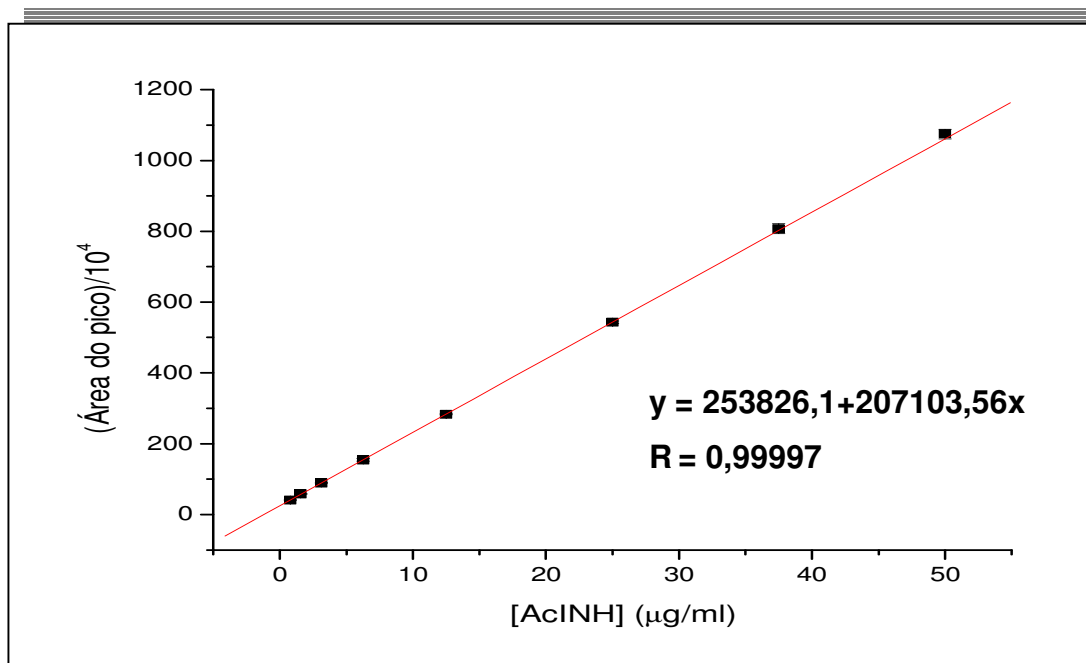
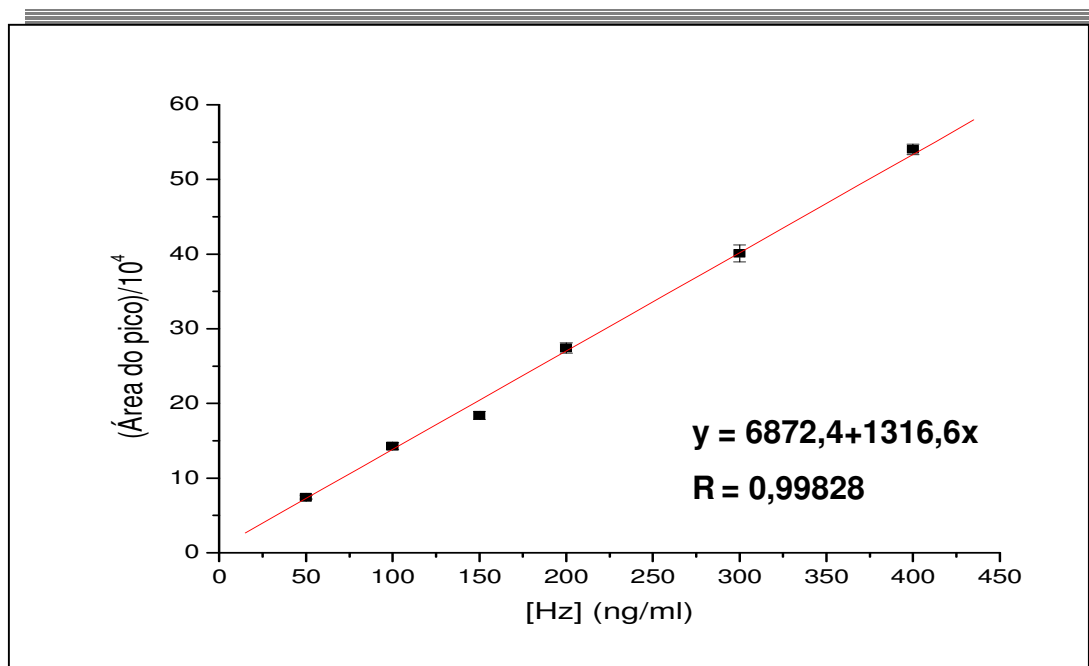


Figura 5. Curva de calibração em soro para acetilisoniazida.

6



Figuras 6. Curva de calibração em soro para hidrazina.

7

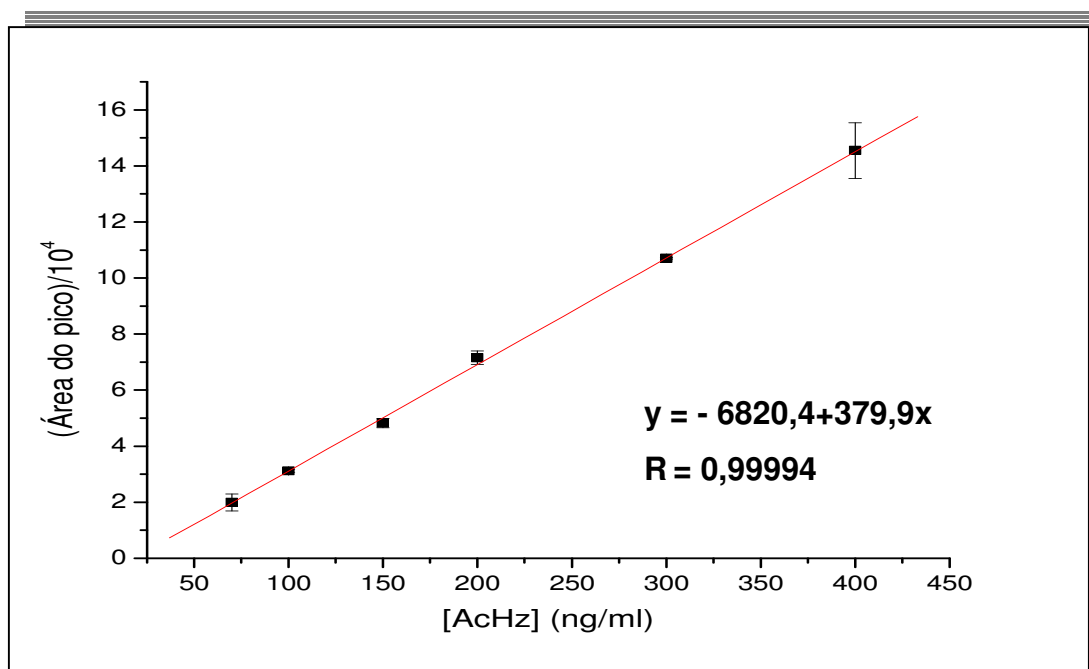


Figura 7. Curva de calibração em soro para acetilhidrazina.

Tabela 2- Estudo de seletividade do método para determinação de INH e metabólitos em soro.

Fármaco	Concentração (ug/ml)	TR (minutos)
Rifampicina	5	ND
Pirazinamida	20	ND
Etambutol	5	ND
AAS	25	ND
Cafeína	10	ND
Cimetidina	3	ND
Ranitidina	0,5	ND
Loratadina	0,7	ND
Alopurinol	2	ND

ND = não detectado (0 -30 min); TR = tempo de retenção

Tabela 3- Limites de confiança do método para determinação de isoniazida e metabólitos em soro (n=3).

Composto	Limite de Detecção (ug/ml)	(CV %)
INH	0,050	1,14
Hz	0,025	4,18
AcINH	0,070	3,56
AcHz	0,036	5,86
	Limite de Quantificação (ug/ml)	(CV %)
INH	0,078	4,02
Hz	0,041	4,19
AcINH	0,100	3,30
AcHz	0,060	5,87
	Linearidade (ug/ml)	(R)
INH	0,780 - 75	0,99993
Hz	0,050 - 0,8	0,99828
AcINH	0,780 - 75	0,99997
AcHz	0,070 - 0,8	0,99994

CV= coeficiente de variação

Tabela 4- Precisão e exatidão do método para determinação de INH e metabólitos em soro.

Concentração adicionada	Intra-ensaio (n=10)		Inter-ensaio (n=5)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (%ES)	Precisão (CV%)	Exatidão (%ES)
INH				
1 ug/ml	2,5	-7,6	7,2	-7,0
10 ug/ml	1,5	-7,2	5,1	-7,3
40 ug/ml	1,3	1,2	4,9	1,1
HZ				
75ng/ml	2,94	-5,8	5,98	-11,84
150 ng/ml	1,97	-0,2	5,04	3,83
300 ng/ml	3,25	-11,6	5,10	3,06
AcINH				
5 ug/ml	2,7	0,3	-	-
15ug/ml	7,3	11,0	-	-
30 ug/ml	3,8	14,8	-	-
AcHz				
100 ng/ml	11,06	3,45	13,91	-6,21
200ng/ml	7,46	-9,67	14,80	13,51
300ng/ml	4,23	-13,91	6,92	-14,6

CV= coeficiente de variação; ES= erro sistemático

Tabela 5- Estabilidade do método para determinação de INH e metabólitos em soro (n=5).

Estabilidade de curta duração			
Composto	ug/ml (CV%)	ug/ml (CV%)	ug/ml (CV%)
INH	1 (7,14)	10 (8,1)	40 (3,7)
AcINH	1 (47,5)	10 (38,16)	40 (34,6)
Hz	0,04 (2,15)	0,15 (6,13)	0,3 (7,4)
AcHz	0,075 (13,34)	0,2 (11,3)	0,4 (9,33)

Estabilidade de média duração			
	ug/ml (CV%)	ug/ml (CV%)	ug/ml (CV%)
INH	1 (13,05)	10 (7,86)	40 (5,73)
AcINH	1 (78,13)	10 (65,85)	40 (50,30)
Hz	0,04 (11,02)	0,15 (9,9)	0,3 (9,0)
AcHz	0,075 (12,72)	0,2 (12,41)	0,4 (8,44)

CV= coeficiente de variação

5.2. Disposição cinética da INH e metabólitos

O estudo da disposição cinética da INH e metabólitos foi realizado a partir do desenvolvimento do método de derivação da INH e Hz com cinamaldeído, tendo limites de quantificação e seletividade adequados para a análise das amostras estudadas. As curvas de concentração plasmática *versus* tempo referentes a INH

e metabólitos, obtidas na investigação dos grupos de animais tratados um com INH e outro com a associação INH mais RMP, estão demonstradas nas Figuras 7 e 8, respectivamente, como média (EPM). Os parâmetros farmacocinéticos da INH e metabólitos estão apresentados nas Tabelas 6 e 7 e nas Figuras 10 e 11 através das médias e erro padrão da média (EPM). A razão metabólito/precursor nos grupos INH e INH+RMP está demonstrada na Tabela 8 e na Figura 12, como média (EPM).

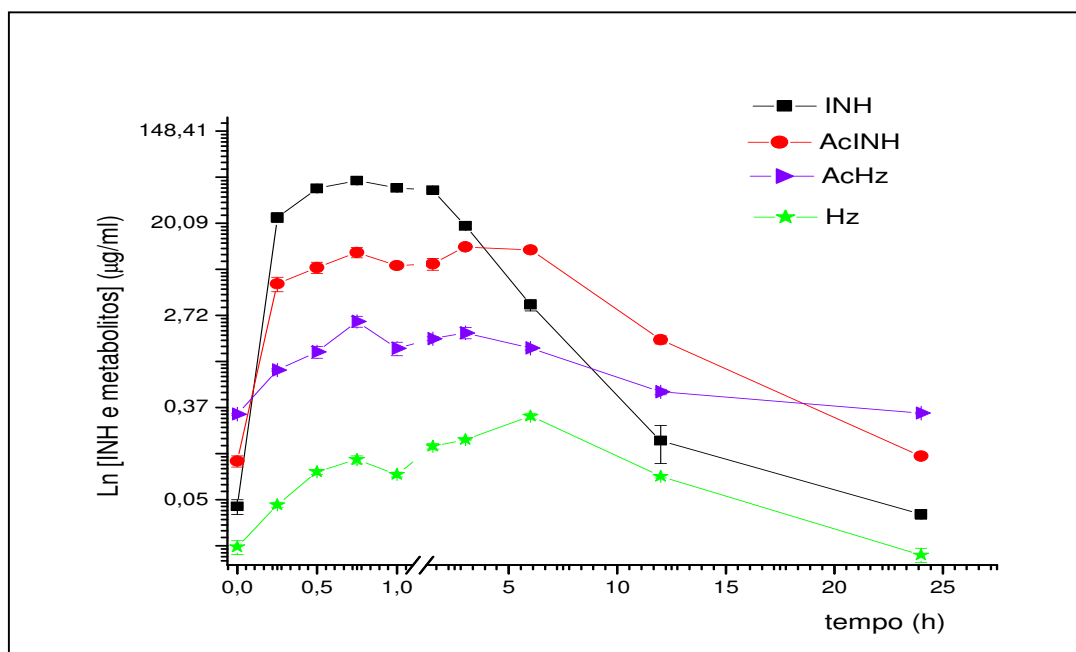


Figura 8. Disposição cinética da INH e metabólitos do grupo tratado com INH.

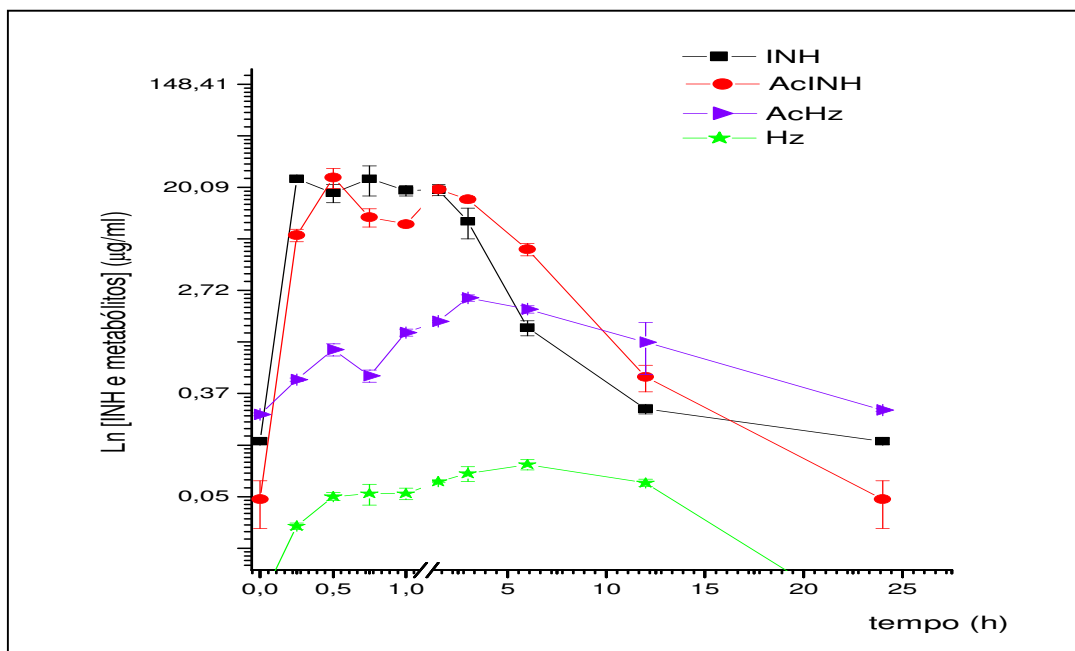


Figura 9. Disposição cinética da INH e metabólitos do grupo tratado com a associação INH mais RMP.

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos da isoniazida. Dados expressos como média (EPM); n= 5.

Parâmetro	Grupo INH isolada	Grupo INH+RMP
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,438 (0,03)	0,394 (0,08)
K_a (h^{-1})	1,6068 (0,100)	2,138 (0,500)
$t_{1/2\beta}$ (h)	1,38 (0,07)	0,98 (0,08) *
K_{α} (h^{-1})	0,5068 (0,024)	0,7246 (0,0676) *
$t_{1/2\beta}$ (h)	3,38 (0,260)	2,688 (0,135) *
β (h^{-1})	0,2096 (0,015)	0,2606 (0,012) *
Cl_T / F ($L \cdot h^{-1} \cdot Kg^{-1}$)	0,6846 (0,016)	1,3494 (0,085) *
Vd/F ($L \cdot Kg^{-1}$)	3,32 (0,19)	5,18 (0,20) *
Cp_{ss} ($\mu g/ml$)	6,1 (0,14)	3,2 (0,22) *

* $p < 0,05$ em relação ao grupo INH; teste t-student ou Mann-Whitney

$t_{1/2\alpha}$ = meia vida de absorção; K_a = constante de velocidade de absorção; $t_{1/2\alpha}$ = meia vida de distribuição; α = constante de velocidade de distribuição; V_d/F = volume de distribuição aparente; Cl_T/F = *clearance* total aparente; $t_{1/2\beta}$ = meia vida de eliminação; β = constante de velocidade de eliminação; C_{pss} = concentração plasmática média no estado de equilíbrio.

Tabela 7. AUC da isoniazida e metabólitos. Dados expressos como média (EPM); n= 5.

Parâmetro AUC^{SS}_{0-24} (ug.h.mL ⁻¹)	Grupo INH isolada	Grupo INH+RMP
INH	146,36 (3,25)	75,42 (5,23) *
Hz	2,8716 (0,074)	1,3196 (0,044) *
AcINH	110,2454 (2,45)	101,8946 (1,43)
AcHz	20,0572 (0,56)	26,8514 (4,1)

* $p < 0,05$ em relação ao grupo INH; teste t-student

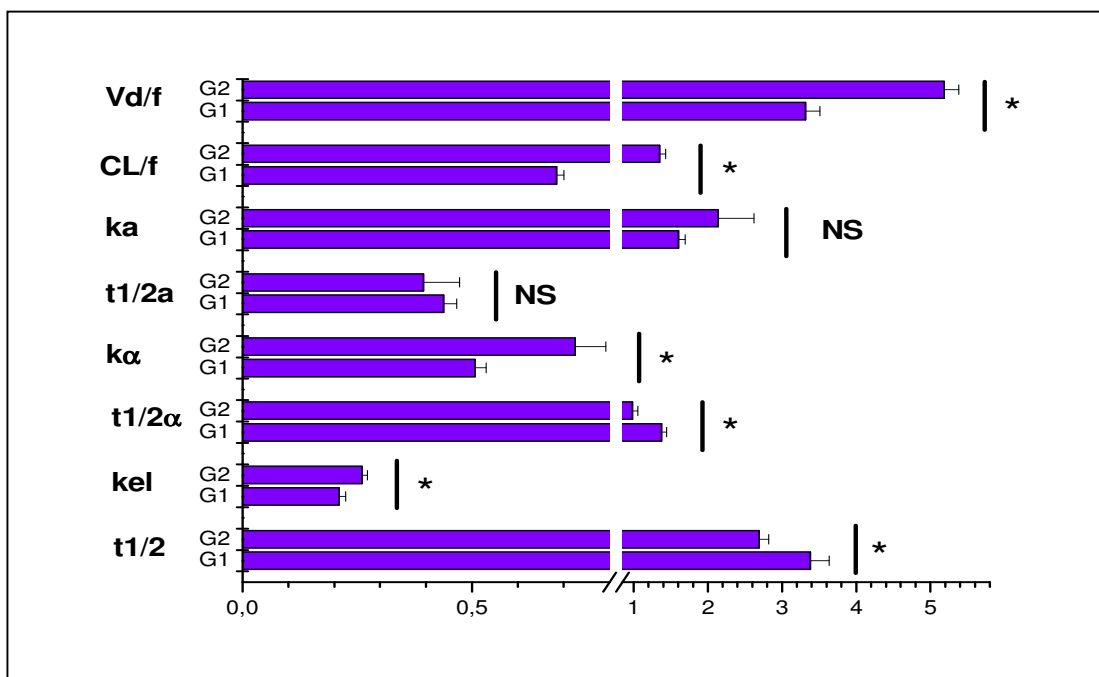
AUC^{SS}_{0-24} = área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

Tabela 8. Razão entre metabólito e composto precursor. Dados expressos como média (EPM); n=5.

Parâmetro AUC^{SS}_{0-24} (ug.h.mL ⁻¹)	Grupo INH isolada	Grupo INH+RMP
Hz / INH	0,020 (0,001)	0,018 (0,001)
AcINH / INH	0,754 (0,017)	1,379 (0,228) *
AcHz / AcINH	0,182 (0,005)	0,265 (0,045) *
Hz / AcHz	0,143 (0,005)	0,052 (0,005) *

* $p < 0,05$ em relação ao G1; teste t-student ou Mann-Whitney

AUC^{SS}_{0-24} = área sob a curva concentração plasmática *versus*

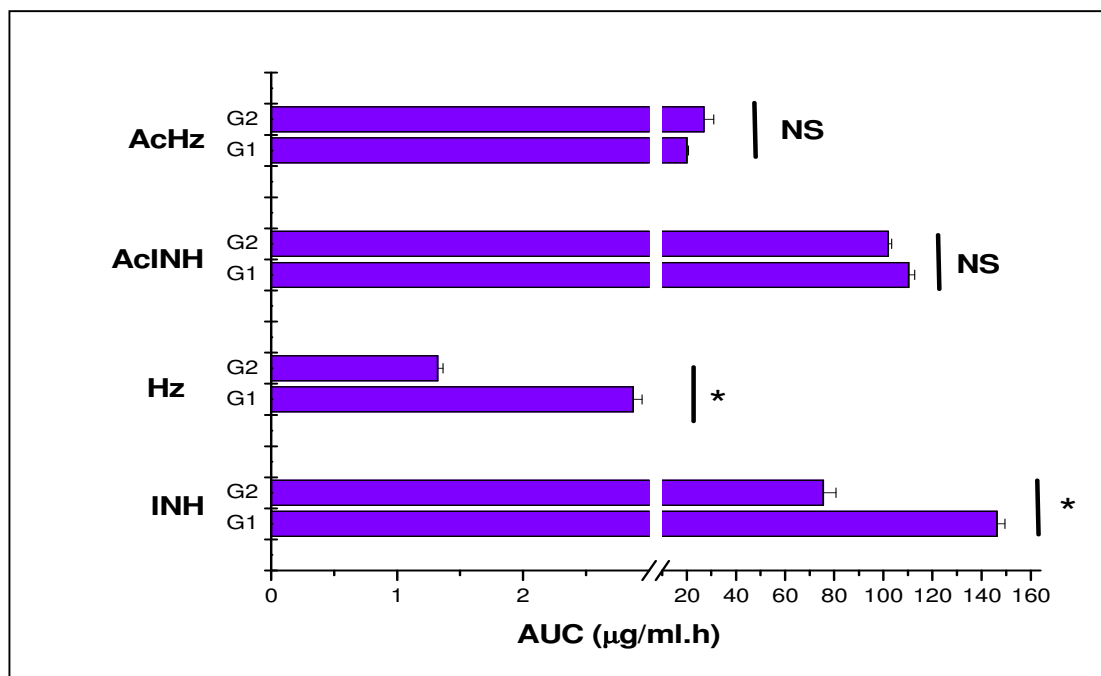


G1= grupo INH; G2= grupo INH+RMP

* $p < 0,05$ em relação ao G1; teste t-student ou Mann-Whitney

NS= não significativo

Figura 10. Comparação entre os grupos INH e INH+RMP em relação aos parâmetros farmacocinéticos: $t_{1/2a}$ = meia vida de absorção; K_a = constante de velocidade de absorção; $t_{1/2\alpha}$ = meia vida de distribuição; α = constante de velocidade de distribuição; V_d/F = volume de distribuição aparente; Cl_T/F = *clearance* total aparente; $t_{1/2\beta}$ = meia vida de eliminação; β = constante de velocidade de eliminação.

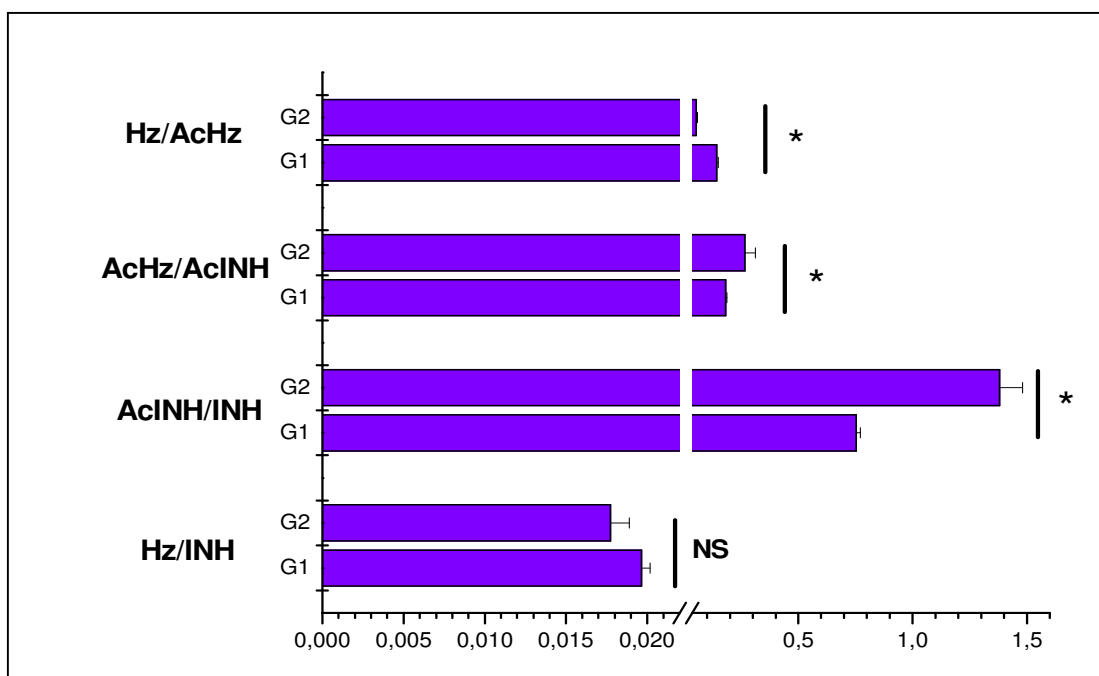


G1= grupo INH; G2= grupo INH+RMP

* $p < 0,05$ em relação ao G1; teste t-student ou Mann-Whitney

NS= não significativo

Figura 11. Comparação entre os grupos INH e INH+RMP em relação à AUC_{0-24}^{SS} .



G1= grupo INH; G2= grupo INH+RMP

* $p < 0,05$ em relação ao G1; teste t-student ou Mann-Whitney

NS= não significativo

Figura 12. Razão entre metabólito e composto precursor.

5.3. Parâmetros Bioquímicos

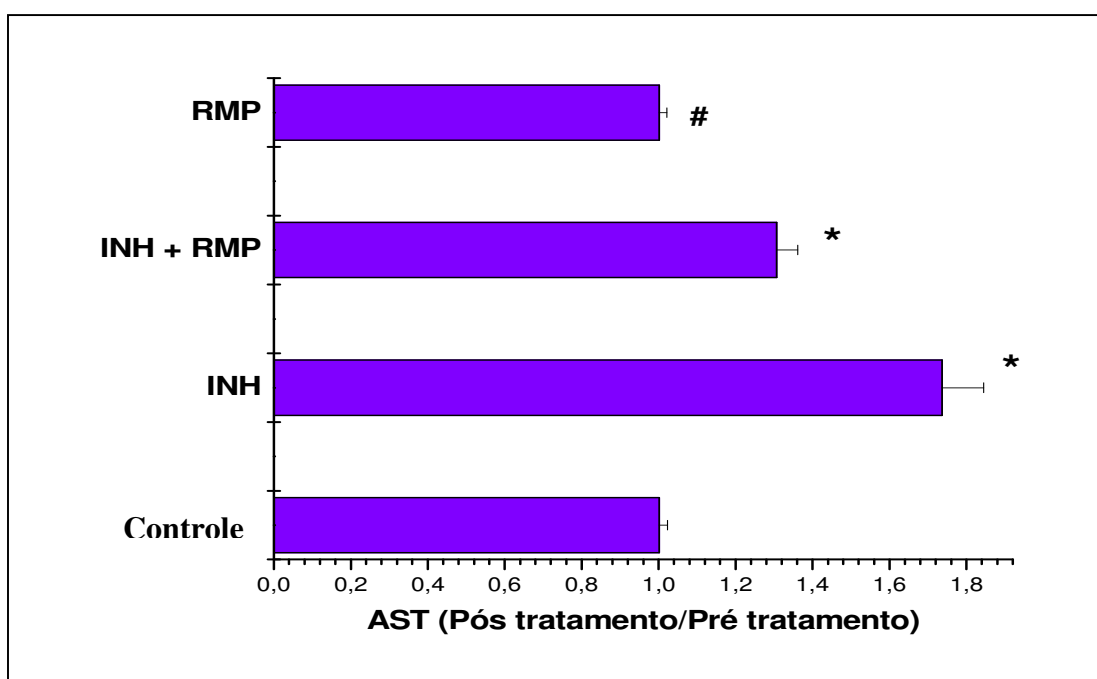
A razão entre a atividade de AST pós tratamento e pré tratamento, para os grupos de animais que tratados com salina, INH, INH associada a RMP e RMP, está demonstrada na tabela 9 e na Figura 13, como média (EPM). A mesma análise foi realizada para ALT, demonstrada na Figura 14.

Tabela 9. Razão entre a atividade de AST e ALT pós e pré tratamento. Dados expressos como média (EPM); n= 5.

Grupo	AST (pós/pré)	ALT (pós/pré)
Controle	1,001 (0,023)	0,801 (0,0205)
INH	1,74 (0,11) *	1,302 (0,070) *
RMP	1,001 (0,021) #	0,88 (0,032) #
INH+RMP	1,31 (0,06) *	0,98 (0,06) #

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (água estéril); Dunn's

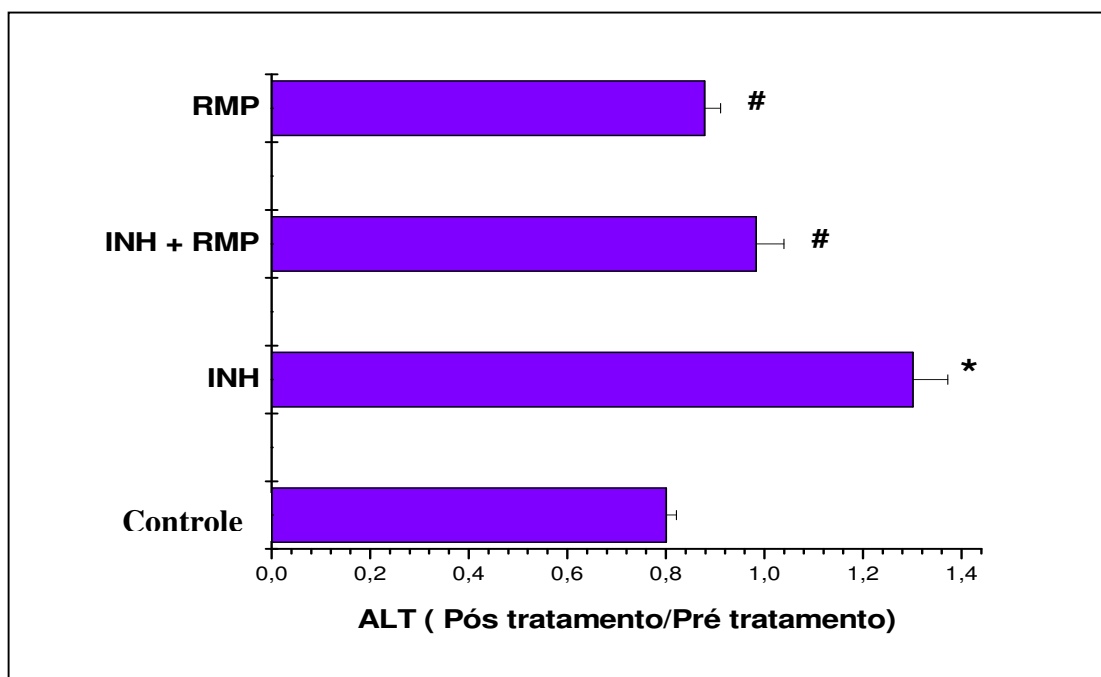
$p < 0,05$ em relação ao grupo INH; Dunn's



* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (água estéril); Dunn's

$p < 0,05$ em relação ao grupo INH; Dunn's

Figura 13. Razão entre a atividade de AST pós tratamento e pré tratamento.



* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (água estéril); Dunn's

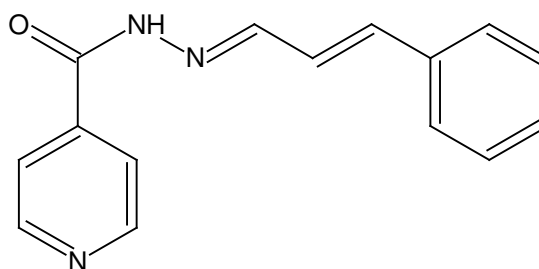
$p < 0,05$ em relação ao grupo INH; Dunn's

Figura 14. Razão entre a atividade de ALT pós tratamento e pré tratamento.

6. DISCUSSÃO

A determinação de isoniazida (INH) e de seus metabólitos hidrazina (Hz), acetilisoniazida (AcINH) e acetilhidrazina (AcHz), através de processo de derivatização com cinamaldeído, tem sido descrita na literatura por vários autores (SADEG et al.,1996; SEIFART et al.,1995; DEFILLIPI et al.,1994; LACROIX et al.,1984). No Presente trabalho, esse procedimento de derivatização resultou na formação de derivados de INH e Hz, separados em coluna de fase reversa C18 e detectados por UV ($\lambda = 340\text{nm}$). Sadeg et al (1996) propõe a fórmula estrutural do derivado resultante da reação da INH com *trans*-cinamaldeído, demonstrada abaixo.

Derivado da isoniazida
formado a partir da reação
com *trans*-cinamaldeído.
(SADEG et al., 1996)



O sistema cromatográfico utilizado mostrou-se satisfatório visto que obtivemos uma adequada separação e resolução dos picos de interesse (Figura 2).

A hidrólise ácida tem sido utilizada por vários autores como recurso para a determinação dos derivados acetilados AcINH e AcHz (SEIFART et al.,1995; von

SASSEN et al., 1985), e foi aplicada no presente estudo com resultados igualmente satisfatórios.

É importante lembrar que a disponibilidade de métodos analíticos destinados ao estudo da farmacocinética é essencial para o conhecimento das relações concentração *versus* efeito produzido pelos fármacos, com base no princípio de que existe uma relação entre o efeito farmacológico ou tóxico com a concentração do fármaco (BAUER, 2000; GENNARO et al., 2001).

As curvas de calibração em soro foram construídas no intervalo de: 0,78 a 50ug/ml para INH na ausência e na presença de hidrólise com coeficientes de correlação de 0,99993 e 0,99999, respectivamente; 0,78 a 50ug/ml para AcINH ($R = 0,99997$); 0,05 a 0,4ug/ml para Hz ($R = 0,99828$) e de 0,07 a 0,4ug/ml para AcHz, ($R = 0,99994$). Os coeficientes de correlação obtidos em nossos estudos foram, com exceção para a curva de Hz, comparáveis aos obtidos por Seifart et al (1995): $R = 0,99979$ e $0,99919$ para INH na ausência e na presença de hidrólise, respectivamente; $R = 0,99991$ para AcINH; $R = 0,99993$ para Hz e $R = 0,0,99905$ para AcHz.

Os limites de detecção (LD) de 0,05ug/ml e 0,07ug/ml obtidos para INH e AcINH foram inferiores aos valores observados nos estudos de Seifart et al (1995) que foram de 0,5ug/ml para ambos os compostos. Os LD da Hz e AcHz, 0,025ug/ml e 0,036ug/ml, respectivamente, foram superiores aos obtidos por Seifart et al. (1995) os quais corresponderam a 0,010ug/ml para ambos os compostos. Sadeg et al (1996), utilizando as mesmas condições cromatográficas reportam limites de detecção na ordem de 20 ng/ml. Von Sassen et al (1985) encontraram valores de limite de detecção na ordem de 1 ug/ml para INH; 0,5

ug/ml para AcHz e 2 ug/ml para AcINH utilizando derivação com cloreto de m-flourobenzoila.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de estabilidade de curta e média duração foram inferiores a 15% para INH, Hz e AcHz (Tabela 5) . Para AcINH encontramos, no estudo de estabilidade de curta duração, valores de coeficiente de variação superiores a 47%, demonstrando a instabilidade do metabólito na amostra biológica (Tabela 5).

O método apresentou coeficientes de variação para o estudo de precisão intra e inter ensaio satisfatórios, inferiores a 15%. Não foi realizado estudo de precisão inter-ensaio para a AcINH devido a sua instabilidade em soro.

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na região de interesse quando submetemos ao método analítico fármacos rotineiramente utilizados para minimizar os efeitos adversos conseqüentes ao tratamento da tuberculose (Tabela 2).

Assim, o método analítico desenvolvido foi considerado adequado para a aplicação em estudos de farmacocinética.

A disposição cinética da INH e seus metabólitos foi estudada através da análise dos parâmetros farmacocinéticos AUC^{SS}_{0-24} = área sob a curva no intervalo de dose de 24 horas, $t_{1/2a}$ = meia vida de absorção; K_a = constante de velocidade de absorção; $t_{1/2\alpha}$ = meia vida de distribuição; $K\alpha$ = constante de velocidade de distribuição; V_d/F = volume de distribuição aparente; Cl_T/F = *clearance* total aparente; $t_{1/2\beta}$ = meia vida de eliminação; β = constante de velocidade de eliminação. Foi utilizado o modelo bicompartimental, que melhor se adaptou aos resultados obtidos. Zhang et al (1992) também utilizou este modelo para a

determinação dos parâmetros farmacocinéticos da INH. Estes parâmetros foram obtidos no grupo de animais tratados somente com INH e no grupo que recebeu a associação INH + RMP.

A meia vida de absorção e sua constante não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre o grupo INH e INH+RMP ($t_{1/2}$ a: $0,438 \times 0,394$ h e K_a : $1,6068 \times 2,138$ h⁻¹, respectivamente). Nossos dados sugerem que não há interferência da RMP na velocidade de absorção da INH, resultados compatíveis com o observado por Thomas et al (1981), que administraram INH (50mg/kg) em coelhos pré tratados com RMP.

No processo de distribuição constatamos diferenças entre os grupos INH e INH + RMP – $t_{1/2}$ α : $1,38 \times 0,98$ h e $K\alpha$: $0,50 \times 0,72$, respectivamente – com V_d superior para o grupo da associação medicamentosa ($5,18$ L/Kg $\times$ $3,32$ L/Kg). Belanger et al (1989), citado por Auclair (2002), apresentam valores de V_{dss} na ordem de $0,29$ e $0,37$ L/Kg para ratos tratados com INH (20 mg/kg) pela via intra-arterial.

As meia vidas de eliminação da INH no grupo INH isolada e no grupo INH + RMP correspondentes a $3,38$ h e $2,69$ h, respectivamente, são diferentes estatisticamente; observamos, então, que no grupo que recebeu a associação medicamentosa houve uma diminuição do parâmetro quando comparado ao grupo INH isolado. Jayaram et al (2004) encontraram valores de meia vida de eliminação de $0,4$ a $1,6$ h para a INH em camundongos tratados com dose única de 120 mg/Kg; Thomas & Solomonraj (1977) observaram meia vida de eliminação de $1,26$ h para ratos tratados com INH (20 mg/kg) *p.o.* Nossos valores são superiores para ambos os grupo tratados quando comparados aos disponíveis na literatura,

no entanto a diferença entre o grupo INH e INH+RMP obtida sugere interferência da RMP no processo de eliminação da INH.

O valor do clearance (Cl) no grupo INH isolada foi de 11,41ml/min.Kg enquanto que no grupo INH + RMP foi de 22,49ml/min.Kg; diferentes estatisticamente. No trabalho realizado por Belanger et al (1989) os valores de Cl obtidos foram de 8,2 a 11ml/min.Kg após administração de INH (20mg/kg) intra-arterial em ratos; compatíveis com o nosso grupo que recebeu INH isoladamente.

Nossos dados inferem que a RMP levou a um aumento do Cl da INH.

Os valores de Cl obtidos em animais são superiores aos descritos na literatura para humanos - variando entre 3,7 e 7,4ml/min.Kg, dependendo do fenótipo acetilador do paciente.

Os resultados referentes a meia vida de eliminação e clearance no grupo INH + RMP, quando comparados com os valores obtidos no grupo INH isolada, foram concordantes visto que em estudos de farmacocinética uma consequência do aumento do clearance é a diminuição da meia vida de eliminação.

Semelhante correlação pode ser feita para os parâmetros $K\alpha$, $t_{1/2\alpha}$ e V_d . Estes parâmetros foram significativamente diferentes no grupo que recebeu a associação INH + RMP quando comparados com o grupo INH isolada. No grupo INH + RMP houve um aumento na constante de velocidade de distribuição com conseqüente diminuição da meia vida de distribuição e aumento do volume de distribuição.

Em nosso trabalho, os valores de AUC_{0-24}^{SS} , para INH e Hz foram estatisticamente menores no grupo que recebeu a associação INH + RMP; as AUC_{0-24}^{SS} da Achz e AcINH não apresentaram diferenças estatísticas

significativas em relação ao grupo que recebeu somente INH (Tabela 7). Noda et al (1983) observaram que, em coelhos pré tratados com RMP (30mg/kg, *p.o.*) por 6 dias, a AUC_{0-8h} da hidrazina e da INH (30mg/Kg) foram significativamente menores quando comparadas ao grupo que recebeu INH sem pré tratamento com RMP. Não encontraram diferenças para os derivados acetilados AcINH, AcHz e diacetilHz; resultados compatíveis com os obtidos no presente trabalho.

Noda et al (1983), ainda, realizaram estudos histopatológicos e avaliaram o conteúdo de CYP450 no tecido hepático e encontraram extensas áreas de necrose com infiltração neutrofílica e valores significativamente maiores de CYP450 no grupo pré tratado com RMP quando comparado ao grupo que recebeu apenas INH.

Com base nesses achados, os autores sugerem que a principal via metabólica da Hz seja mediada pelo CYP450 que, por oxidação, leva à produção de N_2 e outras hepatotoxinas; e que essa via metabólica é induzida pela RMP.

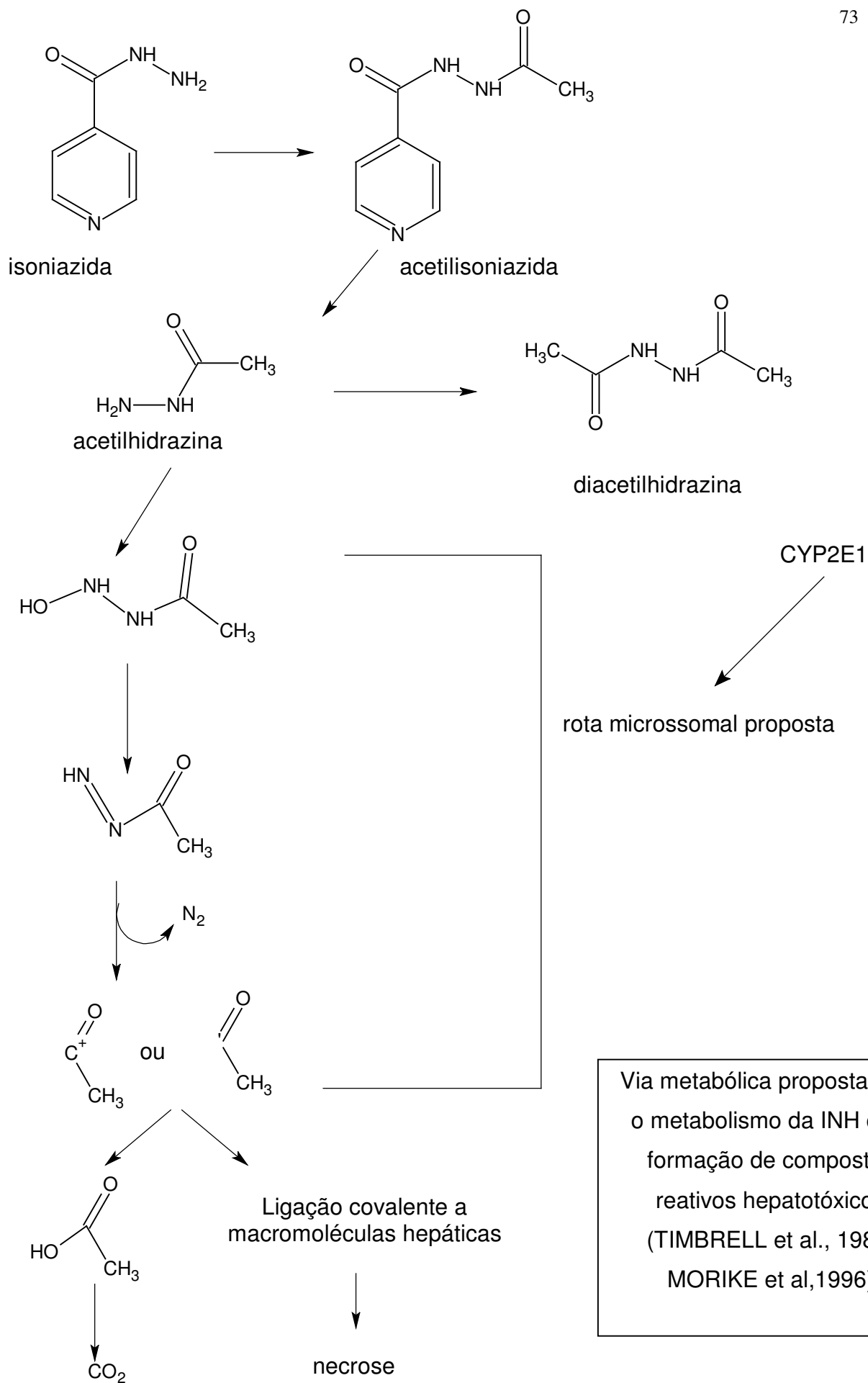
Em trabalho realizado por Zhang et al (1992) foram encontrados níveis plasmáticos de AcHz em ratos Wistar pré-tratados com RMP mais baixos do que aqueles encontrados no grupo que recebeu somente INH. Os autores sugerem que a RMP induz a conversão da AcHz em metabólitos reativos por estímulo do processo de oxidação.

Segundo Lauterburg et al (1985), a acetilhidrazina necessita de ativação metabólica através das monooxigenases para produzir intermediários reativos que ligam-se covalentemente à macromoléculas hepáticas e então produzir dano. Então, sugere que a administração simultânea de rifampicina, que possui

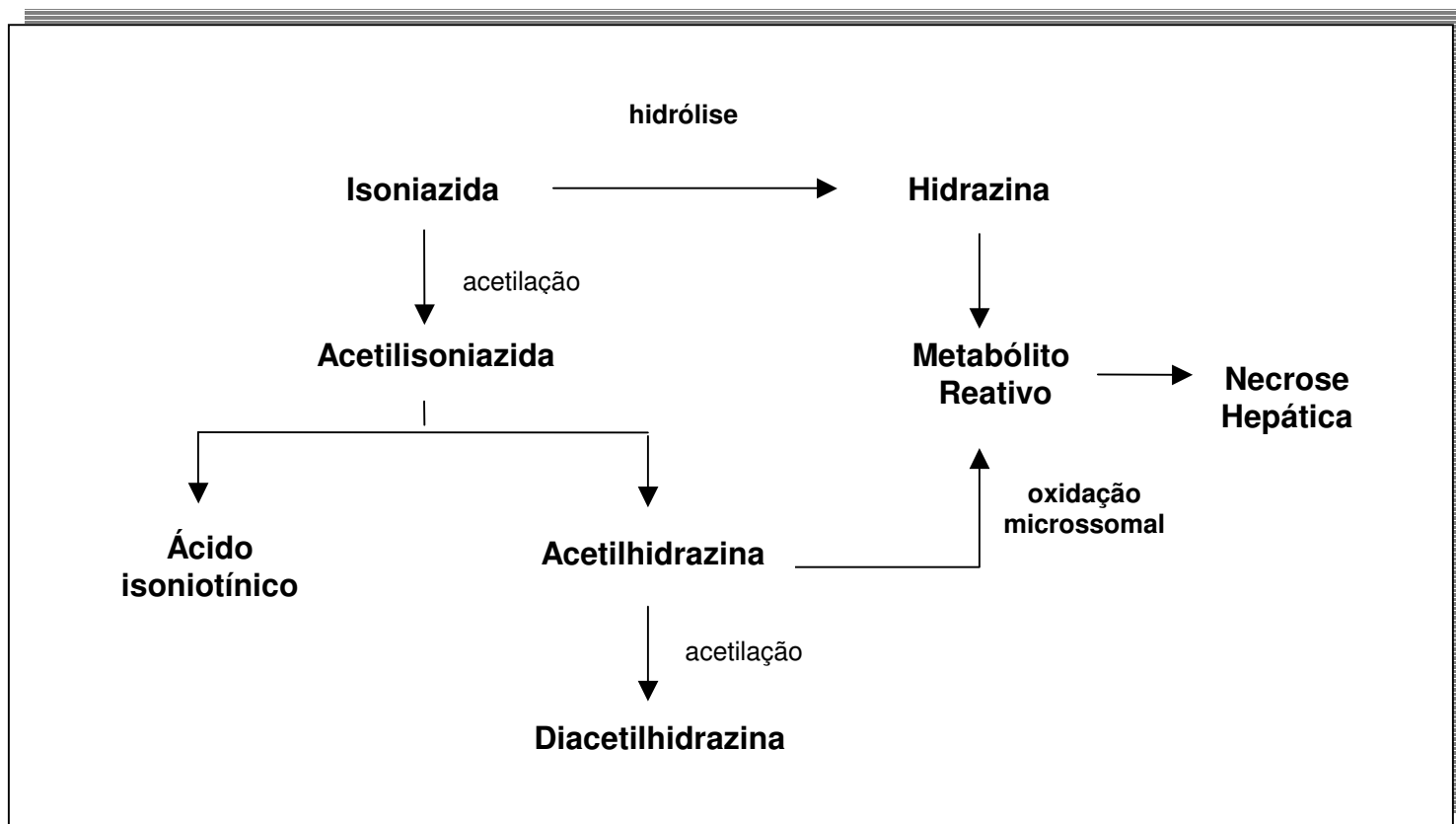
capacidade de induzir esses sistemas enzimáticos, leva ao aumento do dano hepático.

Em suma, o metabolismo da INH está descrito na literatura como sendo composto por duas rotas: uma via de acetilação, através da ação da N-acetiltransferase 2 (NAT-2), que leva a formação dos derivados acetilados AcINH e AcHz; e outra via metabólica, pela qual a INH é hidrolisada à Hz, com conseqüente formação de ácido isonicotínico. A acetilhidrazina e hidrazina formadas são oxidadas por ação de CYP2E1 para formar metabólitos reativos que supostamente são capazes de causar danos hepáticos (HUANG et al, 2003; DAVIES, 1998; MORIKE et al, 1996).

Morike et al (1996) estudaram o metabolismo da acetilhidrazina em ratos e concluíram que a sua degradação leva à produção de N_2 e Co_2 , Huang et al (2003) complementam a rota metabólica de Morike et al (1996), sugerindo o envolvimento de CYP2E1 no metabolismo da AcHz, conforme ilustrado a seguir.



Davies (1998) propõe uma rota metabólica onde o metabolismo da Hz leva à produção de intermediários hepatotóxicos, conforme figura abaixo.



No presente trabalho, utilizamos a razão metabólito/precursor para evidenciar alterações – indução ou inibição - nas vias metabólicas da INH. Vale ressaltar que essas determinações foram feitas em soro e não em urina e, portanto, a avaliação apresenta limitações.

A razão entre os derivados acetilados AcINH e AcHz e seus compostos precursores no grupo que recebeu a associação INH + RMP foi significativa mente maior quando comparada ao grupo que recebeu somente INH (Tabela 8) e a razão Hz/AcHz foi significativamente menor no grupo da associação.

Timbrell et al (1985) reportam que a acetilação da acetilhidrazina é inibida pela RMP em ratos; dessa forma, o aumento da razão AcHz/AcINH poderia ser explicada pela diminuição da acetilação para formar diacetilhidrazina. No entanto, conforme discutido anteriormente, outra via metabólica da AcHz, a oxidação pela enzimas microssomais – supostamente CYP2E1 – é induzida pela RMP, o que levaria à degradação do composto de maneira significativa. É provável, então, que outros mecanismos ainda não elucidados estejam envolvidos nesse aumento dos derivados acetilados no grupo da associação.

A diminuição da razão Hz/AcHz encontra base no fato de que há aumento da degradação da Hz por indução da atividade das enzimas microssomais – conforme discutido anteriormente - e diminuição do consumo da AcHz para formar diacetilhidrazina –conforme inferem Timbrell et al(1985).

Belanger et al (1989) avaliaram a AUC da INH e AcINH em ratos tratados com dose única de INH (20mg/Kg) intra-peritonal ou intra-arterial e observaram resultados de 42,6 e 8,4µg/ml.h, respectivamente, no ciclo de claro. Valores de 30,7 e 12,8 µg/ml.h foram obtidos quando a coleta foi realizada na fase de escuro.

Concluíram, então, que existe variação nos valores de AUC para a INH e seus metabólitos, considerando que a N-acetiltransferase possui maior atividade (135,3nmol/mg vs 59nmol/mg) no período noturno.

A administração dos fármacos, em nosso trabalho, foi realizada sempre na fase de claro, porém a coleta foi feita nos dois períodos de luz. É importante ressaltar que o mesmo procedimento foi aplicado nos dois grupos estudados, em todas as coletas realizadas, o que minimiza as possíveis diferenças na produção de metabólitos decorrentes da distinta atividade de enzimas nos ciclos de luz.

A hepatotoxicidade induzida pela administração de INH, segundo alguns pesquisadores, ocorre com maior frequência e severidade entre pacientes que recebem INH + RMP, o que é atribuído a interações farmacocinéticas que resultam em modificações no metabolismo da INH, havendo maior produção de metabólitos supostamente hepatotóxicos (SHARMA, 2004; DOUGLAS & MCLEOD, 1999; SKAKUN et al., 1985).

Desta forma a avaliação da formação destes metabólitos pode determinar se o dano hepático vai ocorrer (MADDREY, 2005).

Um dos objetivos deste estudo foi verificar se a associação INH + RMP leva a modificações na taxa de formação de um ou mais metabólitos da INH quando comparada à administração da INH isolada e se possíveis alterações no metabolismo relacionam-se com o aparecimento de dano hepático mensurado através da atividade das transaminases ALT e AST.

Entre os critérios estabelecidos para a determinação de hepatotoxicidade, têm sido utilizados - o aumento da atividade sérica de AST e ALT três vezes superior ao valor estipulado como referência (RAVINDEL et al., 2006; MADREY, 2005; ATTRI et al., 2000; CASTILLO et al., 1981) e os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para classificar o grau de hepatotoxicidade induzida por fármacos: Grau 1 ALT - 51–125 UI/L, ou 1.25–2. superior ao basal; Grau 2 ALT - 126–250 UI/L, ou 2.6–5.0 superior ao basal; Grau 3 ALT - 251–500 UI/L, ou 5.1–10.0 superior ao basal; Grau 4 ALT >500 UI/L, ou >10.0 superior ao basal.

Tasduq et al. (2005) demonstraram em seus estudos que os biomarcadores de toxicidade hepática presentes no soro e no fígado, incluindo AST e ALT, foram

significativamente estimulados depois da administração de drogas anti-tuberculose em modelo animal. Para a realização de seus estudos, foram utilizados ratos machos da raça Wistar divididos em 4 grupos: animais tratados somente com veículo (controle); animais tratados com INH (50mg/kg, p.o.) e RMP (250mg/kg, p.o.); animais tratados com INH (50mg/kg, p.o.) e RMP (250mg/kg, p.o.) e PYR (100mg/Kg, p.o.) e grupo de animais tratados com INH+RMP+PYR nas mesmas doses citadas anteriormente, mais o agente silymarin (50mg/kg, p.o.), suposto composto de ação hepatoprotetora. As atividades das enzimas AST, ALT e ALP foram utilizadas como indicadores de lesão hepática. Os autores observaram, no grupo INH+RMP, um aumento de AST e ALT, respectivamente, de 148% e 220%, quando comparados ao grupo controle; ALP aumentou em 101% comparado ao controle e bilirrubina apresentou-se 96% mais elevada que o grupo controle.

Em nosso trabalho, a determinação da atividade sérica de AST e ALT foi realizada em dois momentos: anteriormente ao início da administração dos fármacos estudados e da água estéril, para os devidos grupos experimentados (tempo zero); e ao término do experimento, após 21 dias de tratamento (tempo 21). Os valores obtidos a partir da análise das primeiras amostras coletadas foram considerados como basais.

Como resultados obtivemos valores de AST, após o término do experimento, superiores aos valores basais para os grupos que receberam INH isolada e INH + RMP, enquanto que para os grupos controle e RMP, estes valores se mostraram sem alterações estatisticamente significativas em relação ao tempo zero de coleta. Entretanto, a atividade de ALT no 21º dia de tratamento foi inferior aos valores considerados basais para os grupos controle.

A diminuição na atividade de ALT após um período relativamente longo de administração de INH e RMP foi semelhantemente observado em estudos realizados por Lenaerts et al (2005), que avaliaram a atividade de ALT e AST em camundongos tratados com INH (150mg/kg), INH + RMP (150+75 mg/kg) e RMP+PYR (150+75+1g/kg) por 4 semanas e encontraram valores mais elevados de ALT para o grupo tratado com RMP+PYR quando comparado ao grupo controle (26,2UI/L vs 12 UI/L, respectivamente).

No mesmo trabalho, os autores avaliaram a atividade das transaminases após 2 semanas e 4 semanas em camundongos infectados com *M. tuberculosis* que receberam doses diárias de INH (150mg/kg), INH + RMP(150+75 mg/kg) e RMP+PYR (150+75+1g/kg). Observaram que no grupo que recebeu RMP+PYR ocorreu aumento na atividade da ALT na segunda semana quando comparado ao grupo controle (114,4UI/L vs 26,7 UI/L, respectivamente), que retornou a valores próximos ao controle após 4 semanas, e não diferentes estatisticamente (58,9 UI/L vs 35 UI/L).

Segundo os autores, os resultados de ALT indicam que a infecção por *M. tuberculosis* acelera a indução de dano hepático e que o decréscimo da atividade da ALT é um fenômeno esperado após tratamento prolongado uma vez que o dano inicial resulta em perda de tecido hepático e perda de conteúdo celular.

No trabalho de Lenaerts (2005), os estudos histopatológicos não revelaram dano hepático significativo em nenhum dos grupos.

Nossos resultados referentes as transaminases séricas estão demonstrados na tabela 9 através da razão entre atividade pós e pré tratamento,

para ambas as enzimas. Valores superiores a 1,00 revelam que houve um aumento na atividade enzimática no tempo 21.

Tendo o grupo controle como referência, podemos observar que os grupos tratados com INH e com a associação INH + RMP apresentaram valores de razão de AST pós e pré tratamento superiores e estatisticamente significativos em relação a este grupo. Os animais tratados somente com RMP não apresentaram diferenças relevantes quando comparado ao grupo controle.

Estes dados revelam que o tratamento realizado somente com RMP não provoca qualquer alteração significativa relacionada a função hepática, não havendo indícios de ocorrência de dano hepático, segundo a análise do parâmetro bioquímico AST.

É importante ressaltar que não encontramos diferenças estatísticas significativas na atividade das transaminases entre o grupo INH isolada e a associação.

Os dados obtidos nesse trabalho reforçam as conclusões feitas por Yue et al. (2004), que concluíram que a combinação INH + RMP, em um período de administração relativamente curto, não exacerba a hepatotoxicidade induzida pela INH.

Yue et al (2004), realizaram seus estudos utilizando ratos machos da raça Wistar (n = 36) divididos em 3 grupos: animais tratados com INH (100mg/kg, ip); animais tratados com INH+RMP (100mg/kg, ip) e animais não tratados (água estéril) e concluíram que durante o metabolismo da INH, hidrazina é produzida diretamente (a partir da INH ou indiretamente (a partir da AcHz).

Os estudos de Yue et al (2004) demonstraram que a Hz está relacionada com a hepatotoxicidade induzida pela administração de INH em ratos, o que coincide com os dados obtidos por Sarich *et al.* Houve correlação entre a atividade de CYP2E1 e a concentração plasmática de hidrazina, o que sugere que a indução desta isoforma do CYP450 pode ser mediada pela hidrazina. A combinação INH+RMP, em um curto período de administração, não exacerbou a hepatotoxicidade induzida pela INH, via mecanismo de *down-regulation* da RMP sobre CYP2E1.

Nossos resultados mostraram acentuada diminuição da AUC_{0-24}^{SS} da Hz e INH, menores valores de ALT e iguais valores de AST no grupo que recebeu a associação medicamentosa em relação ao grupo INH isolada, sugerindo que a associação INH+RMP não resulta em aumento da hepatotoxicidade da INH apesar das diferenças observadas nas concentrações plasmáticas desses metabólitos.

7. CONCLUSÕES

- O método analítico desenvolvido e validado para a determinação de INH e de seus metabólitos AcINH, Hz e AcHz apresentou sensibilidade, linearidade, seletividade, precisão e exatidão adequados para a aplicação em estudos de farmacocinética.
- A meia vida de absorção e sua constante ($t_{1/2a}$ e K_a), não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre o grupo INH e INH + RMP.
- Os parâmetros farmacocinéticos K_α e $t_{1/2\alpha}$ mostraram-se diferentes no grupo INH + RMP em relação ao grupo INH isolada, apresentando valor aumentado da K_α e diminuído de $t_{1/2\alpha}$.
- O V_d no grupo que recebeu INH e RMP em associação foi superior ao encontrado no grupo INH isolado.
- No grupo INH + RMP verificamos um aumento na constante de eliminação acompanhado de uma diminuição na meia vida de eliminação e aumento do clearance, quando comparado ao grupo tratado somente com INH.
- A AUC_{0-24}^{SS} da Hz e INH foram significativamente menores no grupo que recebeu a associação INH + RMP, enquanto que a AUC_{0-24}^{SS} da AcHz e AcINH não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre estes dois grupos.

- Verificamos um aumento da razão entre metabólito e composto precursor entre os derivados acetilados AcINH e AcHz e uma diminuição da razão Hz/AcHz no grupo INH + RMP quando comparados ao grupo INH isolada.
- Os grupos tratados com INH e com a associação INH + RMP apresentaram valores de razão de AST pós e pré tratamento superiores e estatisticamente significativos em relação ao grupo controle, porém não encontramos diferenças estatísticas significativas na atividade das transaminases entre o grupo INH isolada e o grupo da associação.
- Os animais tratados somente com RMP não apresentaram diferenças relevantes quando comparado ao grupo controle com relação aos parâmetros bioquímicos analisados.
- Não houve relação entre modificações na farmacocinética da INH no grupo INH + RMP com o desenvolvimento de injúria hepática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASKGAARD, D.S.; WILCKE, T.; DOSSING, M. Hepatotoxicity caused by the combined treatment action of isoniazid and rifampicin. **Thorax**. v. 50, p. 213-214, 1996. In: SHARMA, S.K. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. **Infect Genet Evol**. v. 4, p. 167-170, 2004.
2. ATTRI, S.; RANA, S.V.; VAIPHEI, K.; SODHI, C.P.; KATYAL, R.; GOEL, R.C.; NAIN, C.K.; SINGH, K. Isoniazid and rifampicin induced oxidative hepatic injury – protection by N-acetylcysteine. **Hum Exp Toxicol**. v. 19, p. 517-522, 2000.
3. AUCLAIR, B.; PHARM., D.; MIKOTA, S.K.; D.V.M.; PELOQUIN, A.; AGUILAR, R.; MASLOW, J.N. Population pharmacokinetics of antituberculous drugs and Treatment of *Mycobacterium bovis* infection in bongo antelope (*Tragelaphus Eurycerus Isaaci*). **J Zoo Wildlife Med**. v. 33, n. 3, p. 193-203, 2002
4. BAHRI, A.K.; CHIANG, C.S.; TIMBRELL, A. Acetylhydrazine Hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 60, p. 561-569, 1981.
5. BAUER, L.A. **Applied clinical pharmacokinetics**. New York: McGRAW-Hill, 2000. p. 759.
6. BELANGER, P.M.; LALANDE, M.; DORE, F.M.; LABRECQUE, G. Temporal variations in the pharmacokinetics of isoniazid and N-acetilisoniazid in rats. **Drug Metab Dispos**. v. 17, n. 1, p. 91-97, 1989.
7. BLAIR, I.A.; MANSILLA TINOCO, R.; BRODIE, M.J.; CLARE, R.A.; DOLLERY, C.T.; TIMBRELL, J.A., et al. Plasma hidrazine concentrations in man after

- isoniazid and hidralazine administration. **Hum. Toxicol.** v. 4, p. 195-202, 1985.
- In: SHARMA, S.K. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. **Infect Genet Evol.** v. 4, p. 167-170, 2004.
8. BOROUJERDI, M. **Pharmacokinetics: principles and applications.** New York: McGRAW-Hill, 2002. p. 420.
 9. BOXENBAUM, H.G.; RIEGELMAN, S. Determination of isoniazid and metabolites in biological fluids. **J Pharm Sci.** v. 63, n. 8, p. 1191-7, 1974.
 10. BOWERSOX, D.W.; WINTENBAUER, R.H.; STEWART, G.L.; ORME, B.; BARRON, E. Isoniazid dosage in patients with renal failure. **N Engl J Med.** v. 289, n. 2, p. 84-7, 1973.
 11. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de normas para o controle da tuberculose. **J Pneumol.** v. 23, n. 6, p. 281-310, 1997.
 12. CAWELLOW, W. **Parameters of Compartment-free Pharmacokinetics: stanardisation of Study Design, Data Analysis and Reporting.** Aachen: Shaker Verlag, 2003. p. 163.
 13. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.** 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 1091p.
 14. CASTILLO, J.; LEMA, M.; CAMASELLE, L.; ALSHABEN, W.; CERVINO, L.; SALGUEIRO, M.; NOYA, M. Hepatotoxicidad por isoniácida. **Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.** v. 60, p. 595-602, 1981.

15. CHANG, K.H. **Avaliação da Bioequivalência de comprimidos contendo hidroclorotiazida.** São Paulo, 2002, 188p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. São Paulo, 2002.
16. CHEN, J.; RAYMOND, K. Roles of in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. **Ann Clin Microbiol antimicrob.** v. 5, n. 3, p. 1-11, 2006.
17. CHIEN, J.Y.; THUMMEL, K.E.; SLATTERY, J.T. Pharmacokinetic consequences of induction of CYP2E1 by ligand stabilization. **Drug Metab Dispos.** v. 25, n. 10, p. 1165-1175, 1997.
18. DAVIES, D.M.; FERNER, R.E.; GLANVILLE, H. **Textbook of adverse drug reactions.** 5th ed. London: Chapman & Hall Medical, 1998. p. 290-292.
19. DEFILIPPI, A.; PIANCONE, G.; COSTA, L.R.; BALLA, S.; TIBALDI, G.P. High-performance liquid chromatography with detection and diode-array UV confirmation of isonicotinic acid hydrazide in cattle milk. **J Chromatogr B Biomed Appl.** v. 656, n. 2, p. 466-471, 1994.
20. DICKINSON, J.; GUY, A.; MITCHISON, D.A. Bioavailability of Rifampicin in Experimental Murine Tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 36, n. 9, p. 2066-2067, 1992.
21. DOUGLAS, J.G.; MCLEOD, M.J. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. **Clin Pharmacokinet.** v. 37, n. 2, p. 127-46, 1999.

22. ELLARD, G.A. The potential clinical significance of the isoniazid acetylator phenotype in the treatment of pulmonary tuberculosis. **Tubercle**. v. 65, n. 3, p. 211-27, 1984.
23. ELLARD, G.A. Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 19, 5Pt2, p. 610-25, 1976.
24. ELLARD, G.A.; GAMMON, P.T.; WALLACE, S.M. The determination of isoniazid and its metabolites acetylisoniazid, monoacetylhydrazine, diacetylhydrazine, isonicotinic acid and isonicotinylglycine in serum and urine. **Biochem J.** v. 126, n. 3, p. 449-58, 1972.
25. ELLENHORN, M.J.; BARCELOUX, D.G. **Medical toxicology**. New York: Elsevier, 1988. p. 367-372.
26. FERNANDEZ-VILLAR, A.; SOPENA, B.; FERNANDEZ-VILLAR, J.; VAZQUEZ-GALLARDO, R.; ULLOA, F.; LEIRO, V.; MOSTEIRO, M.; PINEIRO, L. The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 8, n. 12, p. 1499-505, 2004.
27. FOUNTAIN, F.F.; TOLLEY, E.; CHRISMAN, C.R.; SELF, T.H. Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: a 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic. **Chest**. v. 128, n. 1, p. 116-23, 2005.

28. FURESZ, S. Chemical and biological properties of rifampicin. **Antibiot. Chemother.** v. 16, p. 316-351, 1970. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. GOODMAN & GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGRAW-Hill, 2004. p. 852-855.
29. GANGADHARAM, P.R.J. Isoniazid, rifampin and Hepatotoxicity. **Am. Rev. Respir Dis.** v. 133, p. 963-965, 1986.
30. GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics.** 4th ed. London: Lea & Febiger, 1991. p. 406.
31. GENNARO, M.C.; CALVINO, R.; ABRIGO, C. Ion interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography determination of anti-tuberculosis drugs and metabolites in biological fluids. **J Chromatogr B.** v. 754, p. 477-486, 2001.
32. GROSSET, J.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LACROIX, C.; JI, B. Antagonism between Isoniazid and the Combination Pyrazinamide-Rifampicin against Tuberculosis Infection in Mice. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 36, n. 3, p. 548-551, 1992.
33. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **GOODMAN & GILMAN:** as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGRAW-Hill, 2004. p. 852-855.

34. HUANG, Y.; CHERN, H.; WU, J.; CHANG, S.; CHIANG, C.; CHANG, F.; LEE, S. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology**. v. 37, p. 924-930, 2003.
35. HUSSAIN, Z.; KAR, P.; HUSAIN, S.A. Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. **Indian J Exp Biol**. v. 41, n. 11, p. 1223-32, 2003.
36. HUTCHINGS, D.; ROUTLEDGE, P.A. A single sample saliva test to determine acetylator phenotype. **Br. J. Clin. Pharmacol**. v. 42, n. 5, p. 635-7, 1996.
37. IOANNIDES, C.; PARKE, D.V. The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. **Drug Metab Rev**. v. 22, n. 1, p. 1-85, 1990.
38. JAYARAM, R.; SHANDIL, R.K.; GAONKAR, S.; KAUR, P.; SURESH, B.L.; MAESH, B.N.; JAYASHREE, R.; NANDI, V.; BHARATH, S.; KANTHARAJ, E.; BALASUBRAMANIAN, V. Isoniazid Pharmacokinetics-Pharmacodynamics in a Aerosol Infection Model of Tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemoter**. v. 48, n. 8, p. 2951-2957, 2004.
39. KASHUBA, A.D.M.; BERTINO, J.S.; KEARNS, G.L.; LEEDER, S.; JAMES, A.; GOTSCHALL, R.; NAFZIGGER, A. Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. **Clin. Pharmacol. Ther**. v. 63, p. 540-51, 1998.

40. LACROIX, C.; LAINE, G.; GOULLE, J.P.; NOUVEAU, J. [Microanalysis of isoniazid and acetylisoniazid by high performance liquid chromatography]. **J Chromatogr.** v. 307, n. 1, p. 137-144, 1984.
41. LAUTERBURG, B.H.; SMITH, C.V.; TODD, E.L.; MITCHELL, J.R. Pharmacokinetics of the Toxic Hydrazino Metabolites Formed from Isoniazid in Humans. **Pharmacol Exp Ther.** v. 235, n. 8, p. 566-70, 1985.
42. LEI, B.; WEI, C.J.; TU, S.C. Action mechanism of Antitubercular isoniazid. Activation by Mycobacterium tuberculosis K isolation, and characterization of inhA inhibitor. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 4, p. 2520-6, 2000.
43. LENAERTS, A. J.; JOHNSON, C. M.; MARRIETA, K. S.; GRUPPO, V.; ORME, I. M. Significant increases in the levels of liver enzymes in mice treated with anti-tuberculosis drugs. **Int J Antimicrob Agents.** v. 26, p. 152-158, 2005.
44. LOOS, U.; MUSCH, E.; JENSEN, J.C.; MIKUS, G.; SCHWABE, H.K.; EICHELBAUM, M. Pharmacokinetics of oral and intravenous rifampicin during chronic administration. **Klin Wochenschr.** v. 63, n. 23, p. 1205-1211, 1985.
45. MADDREY, W.C. Drug-induced hepatotoxicity. **J Clin Gastroenterol.** v. 39, p. 83-89, 2005.
46. MARIAPPAN, T.T.; SINGH, S. Regional gastrointestinal permeability of rifampicin and isoniazid (alone and their combination) in the rat. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 7, n. 8, p. 797-803, 2003.

47. MEYER, A.; ZANGER, M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. **Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 37, p. 269-96, 1997.
48. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Normas para o Controle da Tuberculose. **J Pneumol.** v. 23, n. 6, p. 281-310, 1997.
49. MOITINHO, E.; SALMERON, J.M.; MAS, A.; BRUGUERA, M.; RODES, J. Severe hepatotoxicity of tuberculostatic agents. Increase of incidence. **Gastroenterol Hepatol.** v. 19, n. 9, p. 448-51, 1996.
50. MORIKE, K.; KOCH, M.; FRITZ, P.; URBAN, W.; EICHELBAUM, M. Identification of N2 as metabolite of acetylhydrazine in the rat. **Arch Toxicol.** v. 70, p. 300-305, 1996.
51. NODA, A.; HSU, K.; NODA, H.; YAMAMOTO, Y.; KUROSUMI, T. Is Isoniazid hepatotoxicity induced by the metabolite, hydrazine? **J. Uoeh.** v. 5, n. 2, p. 183-190, 1983.
52. OGA, S.; BASILE, A.C.; CARVALHO, M.F. **Interações medicamentosas.** São Paulo: Atheneu, 2004. p. 3-42.
53. OHNO, M.; YAMAGUSHI, I.; YAMAMOTO, I.; FUKUDA, T.; YOKOTA, S.; MAEKURA, R.; ITO, M.; YAMAMOTO, Y.; OGURA, T.; KOMUTA, K.; MAEDA, K.; IGARASHI, T.; AZUMA, J. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin induced hepatotoxicity. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** v. 4, n. 3, p. 256-261, 2000.

54. PANDE, J.N.; SUNGH, S.P.; KHILNANI, G.C.; KHILNANI, S.; TANDON, R.K.
Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study.
Thorax. v. 51, n. 2, p. 132-6, 1996.
55. PELOQUIN, C.A.; JARESKO, G.S.; YONG, C.; KEUNG, A.C.F.; BULPITT, A.E.; JELLIFFE, R.W. Population pharmacokinetic modeling of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 41, n. 12, p. 2670-9, 1997.
56. PELOQUIN, C.A.; NAMDAR, R.; DODGE, A.A.; NIX DE. Pharmacokinetics of isoniazid under fasting conditions, with food, and with antacids. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 3, n. 8, p. 703-710, 1999.
57. PEREIRA, R.M.; TRESOLDI, A.T.; HESSEL, G. Insuficiência Hepática pelo Uso de Isoniazida. **Pediatr Gastroenterol**. v. 37, n. 1, p. 72-75, 2000.
58. PERETTI, E.; KARLAGANIS, G.; LAUTERBURG, B.H. Increased urinary excretion of toxic hydrazino metabolites of isoniazid by slow acetylators. Effects of a slow-release preparation of isoniazid. **Eur. J. Clin. Pharmacol**. v. 33, p. 283-6, 1987.
59. RADNER, D.B. Toxicologic and pharmacologic aspect of rifampin. **Chest**. v. 64, p. 213-216, 1973. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. GOODMAN & GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGRAW-Hill, 2004. p. 852-855.

60. RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. p. 121-127.
61. RAVINDEL, P.; VAIPHEI, K.; SIKANDER, A.; SINGH, K.; RANA, S.V. Effect of garlic on isoniazid and rifampicin-induced hepatic injury in rats. **World Gastroenterol.** v. 12, n. 4, p. 636-639, 2006.
62. REY, E.; GENDREL, D.; TRELUYER, J.M.; TRAN, A.; PARIENTE-KHAYAT, A.; d'ATHIS, P.; PONS, G. Isoniazid pharmacokinetics in children according to acetylator phenotype. **Fundam. Clin. Pharmacol.** v. 15, n. 5, p. 355-9, 2001.
63. SARICH, T.C., ZHOU, T., ADAMS, S.P., BAIN, A.I., WALL, R.A., WRIGHT, J.M. A Model of Isoniazid-Induced Hepatotoxicity in Rabbits. **Pharmacol Toxicol Methods**. v. 34, p. 109-116, 1995.
64. SADEG, N.; PERTAT, N.; DUTERTRE, H.; DUMONTET, M. Rapid, specific and sensitive method for isoniazid determination in serum. **J Chromatogr B Biomed Appl.** v. 675, n. 1, p. 113-117, 1996.
65. SEIFART, H.I.; GENT, W.L.; PARKIN, D.P.; VAN JAARSVELD, P.P.; DONALD, P.R. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids. **Chromatogr B.** v. 674, p. 269-275, 1995.
66. SELF, T.H.; CHRISMAN, C.R.; BACIEWICZ, A.M.; BRONZE, M.S. Isoniazid drug and food interactions. **Am. J. Med. Sci.** v. 317, n. 5, p. 304-11, 1999.

67. SHARMA, S.K. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. **Infect Genet Evol.** v. 4, p. 167-170, 2004.
68. SHERMAN, D.R.; MDLULI, K.; HICKEY, M.J.; ARAIN, T.M.; MORRIS, S.L.; BARRY, C.E.; STOVER, C.K. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science.** v. 272, n. 5268, p. 1641-3, 1996.
69. SHISHOO, C.J.; SHAH, S.A.; RATHOD, I.S.; SAVALE, S.S.; VORA, M.J. Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. **Int Pharm.** v. 228, p. 53-67, 2001.
70. SILVA, M. **Tuberculostáticos potenciais:** Síntese de Micelas poliméricas Derivadas do Copolímero Polietileno-Poliaspártico com Isoniazida. São Paulo: USP, 1997. 172 f. Tese (Mestrado em Química Farmacêutica) – Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo.
71. SIPPEL, J.E., MIKHAIL, I.A., GIRGIS, N.I., YOUSSEF, H.H. Rifampin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. **Am. Rev. Respir. Dis.** v. 109, p. 579-580, 1974. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. GOODMAN & GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGRAW-Hill, 2004. p. 852-855.
72. SKAKUN, N.P.; SHMAN'KO, V.V. Synergistic effect of rifampicin on hepatotoxicity of isoniazid. **Antibiot Med Biotekhnol.** v. 30, n. 3, p. 185-9, 1985.

73. STEELE, M.A.; BURK, R.F.; DESPREZ, M. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. **Chest**. v. 99, n. 2, p. 465-471, 1991.
74. TANEJA, D.P.; KAUR, D. Study on Hepatotoxicity and other side-effects of antituberculosis drugs. **J. India Med. Assoc.** v. 88, n. 10, p. 278-280, 1990.
75. TASDUQ, S.A.; PEERZADA, K.; KOUL, S.; BHAT, R.; JOHRI, R.K. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin. **Hepatol Res.** v. 31, p. 132-135, 2005.
76. THOMAS, B.H.; WONG, L.T.; ZEITZ, W.; SOLOMONRAJ, G. Isoniazid metabolism in the rabbit, and the effect of rifampin pretreatment. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol.** v. 33, n. 2, p. 235-247, 1981.
77. THOMAS, B.H.; SOLOMONRAJ, G. Drug interactions with isoniazid metabolism in rats. **J Pharm Sci.** v. 66, n. 9, p. 1322-1326, 1977.
78. THURMAN, R.G.; KAUFFMAN, F.C.; JEFFREY, B. Biotransformation and Zonal Toxicity. In: THURMAN, R.G.; KAUFFMAN, F.C.; JUNGGERMAN, K. **Regulation of hepatic metabolism.** New York: Plenum Press, 1986. cap. 13, p. 321-382.
79. TIMBRELL, J.A.; PARK, B.K.; HARLAND, S.J. A study of the effects of rifampicin on metabolism in human volunteer subjects. **Human Toxicol.** v. 4, p. 279-285, 1985.

80. TIMBRELL, J.A.; MITCHELL, J.R.; SNODGRASS, W.R.; NELSON, S.D. Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism *in vivo*. **Pharmacol Exp Ther.** v. 213, n. 2, p. 364-9, 1980.
81. TIMBRELL, J.A. The role of metabolism in the hepatotoxicity of isoniazid and iproniazid. **Drug Metab Rev.** v. 10, n. 1, p. 125-47, 1979.
82. TIMBRELL, J.A.; WRIGHT, J.M.; BAILLIE, T.A. Monoacetylhydrazine as a metabolite of isoniazid in man. **Clin Pharmacol Ther.** v. 22, n. 5, p. 602-8, 1977.
83. TUCKER, G.T. Advances in Understanding Drug Metabolism and Its Contribution to Variability in Patient Response. **Ther Drug Monit.** v. 22, p. 110-113, 2000.
84. von SASSEN, W.; CASTRO-PARRA, M.; MUSCH, E.; EICHELBAUM, M. Determination of isoniazid, acetylisoniazid, acetylhydrazine and diacetylhydrazine in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr.** v. 338, n. 1, p. 113-122, 1985.
85. WALUBO, A.; SMITH, P.; FOLB, P. The role of oxygen free radicals in isoniazid induced Hepatotoxicity. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** v. 20, n. 8, p. 649-655, 1998.
86. YUE, J.; PENG, R.; YANG, J.; KONG, R.; LIU, J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. **Acta Pharmacol Sin.** v. 25, n. 5, p. 699-704, 2004.

87. ZHANG, R.L.; WANG, Z.Y.; LI, D.; CHENG, W.B. Effects of rifampicin on pharmacokinetics of isoniazid and its metabolite acetylhydrazine in rats. **Zhongguo Yao Li Xue Bao.** v. 13, n. 6, p. 494-496, 1992.
88. ZIMMERMAN, H.J.; ISHAK, K.G. Hepatic injury due to drugs and toxins. In: MACSWEEN, R.N.M.; ANTHONY, P.P.; SCHEVER, P.J. **Patology of the liver.** 4th. ed. London: Churchill Livingstone, 1987. cap. 16, p. 503-573.

[illegible]

PESQUISADORES ASSOCIADOS

Nome	Atividade
Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes	Orientador
Profa. Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini Machado	Farmacocinética Clínica
Helene Jorge De Rosa	Mestrado

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)