

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

***Influência da pirazinamida na
farmacocinética e marcadores de
hepatotoxicidade da isoniazida associada
ou não à rifampicina***

Helen Mariana Baldan

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

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

***Influência da pirazinamida na
farmacocinética e marcadores de
hepatotoxicidade da isoniazida associada
ou não à rifampicina***

Helen Mariana Baldan

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. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara - SP

2006

Vida

Há momentos na vida em que sentimos tanto a falta do passado, que o que mais queremos é sair do sonho e voltar no tempo.

Sonho com aquilo que quero.

Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer aquilo que quero.

Tenho felicidade bastante para fazê-la doce.

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.

Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido.

Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade.

A vida não é de se brincar porque em um belo dia "se morre".

(Clarice Lispector)

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família, preciosidade em minha vida, motivo de grandes alegrias...

Aos meus pais Walter e Neusa por estarem sempre ao meu lado incondicionalmente. Por todo amor, superproteção, compreensão, repreensão e ensinamentos que me fizeram crescer e amadurecer, e que assim me transformou alguém de palavra. Obrigada por me ensinarem sobre a verdade. Amo vocês com todo o meu coração e com toda a minha alma.

Ao meu irmão Cristiano, que mesmo à distância, foi a pessoa sempre que acreditou em mim, fazendo-me lembrar do quanto eu sou capaz. Toda essa força e essa garra de vencer eu devo a você, o meu ÍDOLO, você é o exemplo vivo de um ser humano inteligente, competente, capaz, verdadeiro, honesto, ético, responsável e sempre otimista, mas o mais importante é o amor que sentimos um pelo outro. Mesmo sem você perceber, foste tu quem me levantaste muitas vezes quando tive vontade de parar, mas olho para trás e vejo o que você é hoje e tento me espelhar em ti e logo me reergo, afinal somos irmãos e mesmo que em cidades distantes o nosso coração é único e jamais poderemos deixar a “peteca” cair. Obrigada pelas palavras de conforto e algumas repreensões, rs, pelo apoio e pelo seu amor. Eu SIMPLEMENTE TE AMO.. Ah!! Obrigada também pela cunhadinha linda e lora que me deste, também responsável por me animar e apoiar sempre!!!!

Agora chegou a sua vez Rô, a quem eu poderia dedicar todo esse trabalho?! Agradeço do fundo do meu coração a credibilidade depositada em mim, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico. Você não foi simplesmente uma “colaboradora”, mas uma verdadeira MAMA. Eu sinceramente não consigo encontrar palavras suficientes que expressem o quanto eu devo a você esse momento tão especial. Espero poder seguir seus passos, você é iluminada, guerreira, vencedora, poderosa, enfim... você é EXCEPCIONAL!!!

Obrigada pelos puxões de orelha, rs, pelos conselhos intra e extra-laboratório, pelo colo cedido, pelos abraços e beijos carinhosos, pelas madrugadas quando deixava sua família pra nos acompanhar; além do aprendizado que me deste. Isso jamais alguém poderá retirar de mim.

Você é única, obrigada por todo carinho e confiança, além de todo apoio e amizade demonstrados em todos esses anos de convivência. Eu amo você do fundo do meu coração!!!!!!

Agradecimentos especiais

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela minha vida, pela família maravilhosa que me deste e que tanto me apoiou, agradeço pelas melhores oportunidades que colocou a minha frente, incluindo projeto, “orientadora” e parceira de laboratório, e também pelos obstáculos onde me fez perceber que sou capaz de superá-los; agradeço pela força e garra nos momentos mais críticos do trabalho, e que em momento algum me abandonou, ou melhor, muitas vezes até me carregou em seus braços me consolando e me dando gana pra chegar até aqui e dizer que venci.. (.. o Senhor é meu pastor, e nada me faltará..)

Pois é amiga, esse agradecimento especial vai pra você, Helene, minha companheira, parceira e amiga de todas as horas. Só nós sabemos o que passamos juntas e agora espero que possamos comemorar ao máximo e em alto estilo, rs, porque esse é o nosso momento.

A todos os meus tios e primos, que sempre torceram por mim, via reza, via palavras de ânimo e consolo, seja pessoalmente ou mesmo por telefone, pois só nós sabemos o que essa família é capaz de fazer um pelo outro... Agradeço a cada um especialmente por cada gesto de carinho, sempre soube que pude contar sempre com todos vocês...

Ao prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, meu orientador, uma pessoa de boa índole, um educador no sentido da palavra. Agradecer é pouco, mas mesmo assim obrigada por me dar orientação na vida.

Ao prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, por toda paciência e disponibilidade nos ensinamentos repassados.

À profa. Dra. Márcia Silva, do departamento de fármacos e medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), por ceder o reagente necessário para nossas análises.

Agradecimentos

Ao Marcos, técnico do laboratório de bioquímica Clínica, pela paciência e disponibilidade incondicional em nos ajudar com nossos ratinhos e mantendo sempre seu bom humor. Você é simplesmente um anjo.

Ao Celso do biotério, sempre colaborando conosco nas programações e sempre disponível a nos ajudar com os animais, sem reclamar, por sinal, rs.

Ao “super trio” do almoxarifado sempre nos suportando com bom humor, afinal sempre íamos pentelhar pra fazer umas “comprinhas”, mas é um local composto por pessoas maravilhosas, competentes e responsáveis.

Ao pessoal da farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), Quasy, Tar, Fartura, Karina, Vampeta, Rô e a Bete pelo apoio e auxílio e claro os momentos de descontração.

Aos meus grandes amigos do laboratório: Hell, Quel, Kellynha, Camilão, Arnóbio, França, Thalita e você Sandrinha, pessoas que se tornaram cada dia mais especiais, formamos enfim uma família; obrigada pelo apoio e aos ótimos e contínuos momentos de bom humor, sem contar os “happy hours”, rs.

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

À FURP por ceder todos os fármacos necessários para a realização do projeto.

Ao serviço técnico de Biblioteca e documentação e ao serviço de apoio à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara) pelo auxílio na atualização das referências e correção bibliográfica.

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas (Cláudia, Laura e Sônia) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), pela disposição e atenção constantes em todos os momentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), que me forneceu conhecimentos, formou meu espírito crítico, me deu oportunidade e me ensinou uma pequenina, mas importantíssima coisa, a responsabilidade.

Aos amigos que contribuíram de maneira mais dedicada para que esse trabalho desse certo, meus “300” 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.

Aos meus amigos da igreja que sempre torceram por mim, rezaram em todos os momentos mais complicados e acreditaram na realização do meu sonho.

A você Chuchu por todos esses anos de convivência, que me cativou, me conquistou com esse seu jeitinho japa de ser, pelos nossos momentos felizes e depressivos tanto na facu como em sampa, mas quero que saiba que você se tornou

muito especial e sei o quanto torceu por mim até chegar esse momento. Eu só tenho que te agradecer AMIGA!!

Há também um agradecimento especial à galera da república Pastelaria do Ganso, onde encontrei amigos mais que especiais e loucos, no bom sentido, mas que foram essenciais para os momentos de descontração... Valeu por todo apoio, vocês de alguma forma contribuíram para que eu tivesse forças pra chegar até aqui!!

E enfim, o agradecimento vai a vocês minhas amigas Vanessa, Jênnifer, Vivian, Thais, Simone, Ana Paula e agora até você Malu entrou na minha listinha VIP de amigas que contribuíram de uma forma significativa e inexplicável, me dando forças, me fazendo rir, me fazendo superar todas as dificuldades durante esse período. Me ouviram chorar, reclamar, gargalhar e me deixaram sonhar... Não preciso nem falar o quanto todas vocês são especiais. Afinal somos froes, às vezes Dirces, com alguns ataques TOs, rs, mas no fundo somos verdadeiras DIVAS hahahahaha...

A todos aqueles que não citei aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para que eu terminasse essa dissertação. Muito obrigado a todos.



Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Esquemas

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
1. A importância clínica das interações farmacocinéticas	5
2. Noções gerais sobre parâmetros farmacocinéticos	7
3. Isoniazida, rifampicina e pirazinamida: farmacologia clínica	12
4. Hepatotoxicidade induzida por medicamentos	24
2. OBJETIVOS	33
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
3.1. Casuística	34
3.2. Protocolo Experimental	34
3.3. Métodos Analíticos	36
3.3.1. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos ALT e AST	36
3.3.2. Determinação da INH e seus metabólitos em soro	36
3.3.2.1. Reagentes, Solventes e Soluções	37
3.3.2.2. Sistema Cromatográfico	37
3.4. Procedimento Analítico	38
3.4.1. Curvas de calibração	40
3.4.2. Validação	43
3.4.2.1. Linearidade	43
3.4.2.2. Limite de detecção	43
3.4.2.3. Limite de quantificação	43
3.4.2.4. Precisão e exatidão intra e inter-ensaios	44
3.4.2.5. Estabilidade	44
3.4.2.6. Seletividade	45

3.5. Análise Farmacocinética	46
3.6. Análise estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Determinação de INH e metabólitos	49
4.2. Disposição cinética da INH e metabólitos	58
4.3. Parâmetros bioquímicos (AST e ALT)	72
5. CONCLUSÕES	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

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

AAS: ácido acetil-salicílico

AcHz: acetil-hidrazina

AcINH: acetil-isoniazida

AGA: alfa glicoproteína ácida

ALT: transaminase alanínica

ASAL: ácido arginino-succínico liase

AST: transaminase aspártica

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 Kel : 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 P4502E1

EPM: erro padrão da média

ES: erro sistemático

DAcHz: diacetil-hidrazina

HCl: ácido clorídrico

Hz: hidrazina

K_a : constante de velocidade de absorção

INH: isoniazida

InhA: enoil acil redutase

NAT-2: N-acetiltransferase 2

PYR: pirazinamida

R: coeficiente de correlação

RMP: rifampicina

$t_{1/2 a}$: meia vida de absorção

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

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

TCA: ácido tricloroacético

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

UV-VS: ultra-violeta – visível

V_d/F : volume de distribuição aparente

Figura 1.	Metabolismo da isoniazida e formação de metabólitos hepatotóxicos.....	17
Figura 2.	Fluxograma para a determinação de INH, Hz e compostos acetilados em soro.....	39
Figura 3A.	Cromatograma do derivado de INH adicionada.....	49
Figura 3B.	Cromatograma do derivado de Hz adicionada, em escala distinta.	49
Figura 4.	Cromatograma dos derivados de INH sem hidrólise, em amostra, em tempos distintos.....	50
Figura 5.	Cromatograma dos derivados de INH na presença e ausência de hidrólise.....	50
Figura 6.	Cromatograma do branco.....	51
Figura 7A.	Curvas de calibração em soro (a) INH na ausência de hidrólise; (b) INH na presença de hidrólise.....	52
Figura 7B.	Curva de calibração em soro AcINH.....	53
Figura 7C.	Curva de calibração e soro Hz.....	53
Figura 7D.	Curva de calibração em soro AcHz.....	54
Figura 8A.	Perfil da concentração plasmática versus tempo da isoniazida e metabólitos para o grupo INH isolada.....	58
Figura 8B.	Perfil da concentração plasmática versus tempo da isoniazida e metabólitos para o grupo INH+PYR.....	59
Figura 8C.	Perfil da concentração plasmática versus tempo da isoniazida e metabólitos para o grupo INH+PYR+RMP.....	59
Figura 9.	Disposição cinética da INH nos diferentes grupos.....	60
Figura 10.	AUCs da INH, Hz, AcINH e AcHz nos diferentes grupos.....	64
Figura 11.	Razão metabólito/precursor.....	66
Figura 12A.	Razão pós-tratamento/pré-tratamento da transaminase AST.....	75
Figura 12B.	Razão pós-tratamento/pré-tratamento da transaminase ALT.....	76



Tabela 1.	Sistema cromatográfico em modo gradiente.....	38
Tabela 2.	Estudo da seletividade do método de análise dos derivados de INH e Hz em soro.....	46
Tabela 3.	Limites de detecção, quantificação e linearidade dos métodos de análise dos derivados de INH e Hz em soro.....	55
Tabela 4.	Estabilidade da INH e metabólitos em soro em curta e média duração.....	56
Tabela 5.	Precisão e exatidão dos métodos de análise da INH e metabólitos em soro.....	57
Tabela 6.	Razão pós-tratamento/pré-tratamento das transaminases AST e ALT.....	74



Esquema 1. Vias exacerbadas para formação de Hz.....	68
Esquema 2. Via exacerbada para formação de AcHz.....	70

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração simultânea de PYR sobre os parâmetros farmacocinéticos da INH e a produção de seus metabólitos, em um grupo de animais sob tratamento com INH+PYR e outro com INH+RMP+PYR, bem como de avaliar o comportamento dos biomarcadores de hepatotoxicidade, as transaminases AST e ALT, nesses grupos. Na primeira fase do protocolo experimental foi coletado sangue da cauda dos animais (ratos Wistar, machos, peso~250g) para análise dos biomarcadores como valores basais, em seguida realizou-se a administração, por gavagem, de doses múltiplas de INH (100mg/Kg) (grupo I), INH+PYR (350mg/Kg) (grupo II), INH+PYR+RMP (100mg/Kg) (grupo III), PYR (grupo IV) e água estéril (grupo V – controle) por 21 dias. Para os animais que receberam INH (grupo I, grupo II e grupo III) construiu-se a curva de sua *concentração plasmática x tempo*. Amostras seriadas de sangue foram coletadas em 10 tempos diferentes entre 0-24h; para cada tempo de coleta foram empregados 5 ratos. As amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético a 10%; para análise dos metabólitos acetilados promovendo a hidrólise com HCl 6M; em seguida, a INH e a Hz foram derivatizadas com cinamaldeído. As amostras foram analisadas por HPLC usando coluna Resolve TM C₁₈ e detector UV-VS, operando a 340nm. Os parâmetros farmacocinéticos da INH apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, teste de Tukey) entre os grupos, e sua média e EPM foram: Grupo INH vs Grupo INH+PYR: $t_{1/2\alpha} = 1,4 (0,070)$ vs $1,0 (0,100)$; $K\alpha = 0,51 (0,024)$ vs $0,77 (0,100)$; $t_{1/2\beta} = 3,4 (0,026)$ vs $7,2 (0,910)$; $Kel = 0,21 (0,015)$ vs $0,10 (0,018)$; $Cl_T/F = 0,68 (0,016)$ vs $0,90 (0,047)$; $Vd/F = 3,32 (0,19)$ vs $9,52 (1,52)$; AUC^{0-24}_{ss} INH = $146,36 (3,25)$ vs $111,96 (5,60)$; AUC^{0-24}_{ss} Hz = $2,87 (0,07)$ vs $4,60 (0,09)$; Grupo INH vs grupo INH+RMP+PYR: $Kel = 0,21 (0,015)$ vs $0,13 (0,027)$; $Cl_T/F = 0,68$

(0,016) vs 1,09 (0,061); AUC^{0-24}_{ss} INH = 146,36 (3,25) vs 92,71 (5,00); AUC^{0-24}_{ss} Hz = 2,87 (0,07) vs 1,92 (0,20); AUC^{0-24}_{ss} AcINH = 110,24 (2,45) vs 88,01 (5,00); Grupo INH+PYR vs Grupo INH+RMP+PYR: Cl_T/F = 0,68 (0,016) vs 1,09 (0,061); AUC^{0-24}_{ss} INH = 111,96 (5,60) vs 92,71 (5,00); AUC^{0-24}_{ss} Hz = 4,60 (0,09) vs 1,92 (0,20); AUC^{0-24}_{ss} AcINH = 99,25 (4,70) vs 88,01 (5,00). As razões AUC^{0-24} metabólito/ AUC^{0-24} precursor que apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, teste de Tukey) entre os grupos, e suas médias e EPM foram: Grupo INH vs Grupo INH+PYR: Hz/INH = 0,0196 (0,001) vs 0,041 (0,002); Hz/AcHz = 0,144 (0,005) vs 0,680 (0,035); Grupo INH+PYR vs Grupo INH+RMP+PYR: Hz/INH = 0,041 (0,002) vs 0,021 (0,002); AcHz/AcINH = 0,062 (0,005) vs 0,386 (0,098); Hz/AcHz = 0,680 (0,035) vs 0,062 (0,010). Os parâmetros bioquímicos AST e ALT apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, porém nenhuma diferença entre os grupos que receberam fármacos associados e a INH. Os dados obtidos sugerem que a PYR, quando associada, influencia de maneira significativa nos parâmetros farmacocinéticos da INH como também na formação de seus metabólitos e, embora ocorra aumento estatisticamente significativo na atividade dos biomarcadores em relação ao grupo controle, as associações não apresentam nenhuma ação sinérgica em relação à hepatotoxicidade.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the hepatotoxicity effect, pharmacokinetic response and biotransformation of isoniazid of rats treated with i) isoniazid (INH), ii) INH + pyrazinamide (PYR) and iii) INH + PYR + rifampicin (RMP). Daily doses of the tuberculostatic drugs were administrated intragastrically to the animals (Wistar rats) for one period of 21 days as follow: INH (100mg/Kg) (group I), INH (100mg/Kg) + PYR (350mg/Kg) (group II), INH (100mg/Kg) + PYR (350mg/Kg) + RMP (100mg/Kg) (group III), PYR (350mg/Kg) (group IV) and sterile water (group V, control). 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 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 3; 6; 12 and 24 hours after the dose (five animals for each point). The blood samples were deproteinized with 10% trichloroacetic acid, derivized by 1% cinnamaldehyde. For the determination of the acetylated metabolites acetylisoniazid (AcINH) and acetylhydrazine (AcHz) a previous hydrolysis with 6 M hydrochloride acid was performed. Then, the samples were centrifuged and the supernatant analyzed by liquid chromatograph. 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 ($p < 0.05$, Turkey's test). The results significantly different were: Group INH vs Group INH+PYR: $t_{1/2\alpha} = 1,4 (0,070)$ vs $1,0 (0,100)$; $K\alpha = 0,51 (0,024)$ vs $0,77 (0,100)$; $t_{1/2\beta} = 3,4 (0,026)$ vs $7,2 (0,910)$; $Kel = 0,21 (0,015)$ vs $0,10 (0,018)$; $Cl_T/F = 0,68 (0,016)$ vs $0,90 (0,047)$; $Vd/F = 3,32 (0,19)$ vs $9,52 (1,52)$; $AUC^{0-24}_{ss} (INH) = 146,36 (3,25)$ vs $111,96 (5,60)$; $AUC^{0-24}_{ss} (Hz) = 2,87 (0,07)$ vs $4,60 (0,09)$; Group INH vs group INH+RMP+PYR: $Kel = 0,21 (0,015)$ vs $0,13 (0,027)$; $Cl_T/F = 0,68 (0,016)$ vs $1,09$

(0,061); AUC^{0-24}_{ss} (INH) = 146,36 (3,25) vs 92,71 (5,00); AUC^{0-24}_{ss} (Hz) = 2,87 (0,07) vs 1,92 (0,20); AUC^{0-24}_{ss} (AcINH) = 110,24 (2,45) vs 88,01 (5,00); Group INH+PYR vs Group INH+RMP+PYR: Cl_T/F = 0,68 (0,016) vs 1,09 (0,061); AUC^{0-24}_{ss} (INH) = 111,96 (5,60) vs 92,71 (5,00); AUC^{0-24}_{ss} (Hz) = 4,60 (0,09) vs 1,92 (0,20); AUC^{0-24}_{ss} (AcINH) = 99,25 (4,70) vs 88,01 (5,00). The ratio AUC^{0-24} metabolites/ AUC^{0-24} precursor that showed significant difference were: Group INH vs Group INH+PYR: Hz/INH = 0,0196 (0,001) vs 0,041 (0,002); Hz/AcHz = 0,144 (0,005) vs 0,680 (0,035); Group INH+PYR vs Group INH+RMP+PYR: Hz/INH = 0,041 (0,002) vs 0,021 (0,002); AcHz/AcINH = 0,062 (0,005) vs 0,386 (0,098); Hz/AcHz = 0,680 (0,035) vs 0,062 (0,010). For the biomarkers ALT and AST, all groups were significantly different from the control, however, no difference were detected between the groups. In conclusion, we found that the co-administration of PYR during the treatment of rats with INH or INH+RMP caused a significant alteration in the pharmacokinetic parameters and biotransformation of INH. However, these pharmacokinetic alterations were not followed by the biomarkers of hepatotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

1. A importância clínica das interações farmacocinéticas

O efeito de um fármaco no organismo é decorrente da sua interação nos sítios receptores, e está associado a uma determinada concentração e à sua permanência no local de ação por determinado tempo.

A utilização de mais de um fármaco concomitantemente na terapêutica pode resultar em interações de tal forma que os efeitos farmacológicos esperados ocorram de maneira diferenciada, podendo-se obter um aumento ou uma diminuição da eficácia terapêutica. Da mesma maneira, a interação entre fármacos pode acentuar ou atenuar os efeitos indesejáveis (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; OGA et al., 2002; FUHR, 2000).

As associações medicamentosas podem resultar em interações na fase pré-cinética (antes da absorção propriamente dita), na fase farmacocinética e/ou na fase farmacodinâmica (OGA et al., 2002).

Na fase pré-cinética reações entre os princípios ativos podem resultar em diminuição da absorção ou aumento da toxicidade (ex: a colestiramina e o colestipol complexam uma série de medicamentos como antidepressivos, neurolépticos, digitálicos e anticoagulantes, diminuindo a sua disponibilidade para a absorção) (OGA et al., 2002). Na fase cinética pode ocorrer modificações na absorção, na distribuição, na biotransformação ou na excreção com a administração concomitante.

A absorção é um dos fenômenos cinéticos mais importantes na determinação da concentração sérica de fármacos por via oral, tópica ou parenteral, com exceção da via intravascular. A redução no grau de absorção ocasiona redução do seu nível plasmático e tende a prejudicar a eficácia terapêutica. Entre os parâmetros

farmacocinéticos mais utilizados para o estudo de absorção estão: a concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo necessário para alcançar a concentração máxima (t_{max}).

A alteração na fase de distribuição, quando há associação de dois componentes medicamentosos, se dá principalmente por mecanismo competitivo frente a sítios comuns de ligação protéicos, sendo a albumina a proteína ligante mais importante e responsável pela fixação de compostos ácidos e a alfa glicoproteína ácida (AGA) pela fixação de fármacos de caráter básico (OGA et al., 2002). O efeito da interação entre dois fármacos por competição junto às proteínas resulta no aumento da fração livre de um dos fármacos ou de ambos, com intensificação de suas ações farmacológicas terapêuticas ou mesmo tóxicas.

A significância clínica dessas interações é evidente, especialmente quando os fármacos que interagem possuem alta fixação, ou seja, ligam-se às proteínas plasmáticas com uma porcentagem acima de 75-80% (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

As interações de fármacos na fase de biotransformação podem resultar em indução ou inibição de sistemas enzimáticos, principalmente sobre o citocromo P450 (CYP450); além da possibilidade de saturação do processo de biotransformação por competição entre esses fármacos pelos sistemas enzimáticos (HARDMAN & LIMBIRD, 2004, LIN & LU, 1997). Assim a alteração metabonômica causada por um fármaco pode afetar a velocidade de biotransformação de outros fármacos e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade e a eficácia terapêutica. A inibição da biotransformação de um fármaco resulta quase sempre na exacerbação dos efeitos farmacológicos e/ou tóxicos.

É importante ressaltar que a biotransformação ou metabolismo de fármacos, ao gerar metabólitos mais hidrofílicos, torna-se fundamental para a sua eliminação, em especial de fármacos altamente lipofílicos; no entanto, o metabolismo pode levar à formação de produtos tóxicos, causando o aparecimento de efeitos deletérios ao organismo. A fase da farmacocinética mais susceptível aos efeitos das associações medicamentosas é a biotransformação (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Entre os mecanismos envolvidos nas interações de fármacos durante a excreção, particularmente por via renal, é importante ressaltar os seguintes: i)- alteração do pH do líquido intra-tubular que promove modificação no grau de dissociação de eletrólitos fracos, ocasionando sua maior ou menor excreção renal e ii)- duas substâncias que podem competir entre si, na secreção tubular, por apresentarem afinidade às mesmas proteínas transportadoras; nessas situações, ambas terão excreção retardada.

Condições patológicas pré-existentes no indivíduo, especialmente as insuficiências cardíaca, renal ou hepática, são decisivas para intensificação dos efeitos adversos dos medicamentos, e podem levar geralmente ao acúmulo de fármacos no organismo (OGA et al., 2002).

2. Noções gerais sobre parâmetros farmacocinéticos

A farmacocinética compreende quatro processos fundamentais: a absorção (quando a administração do fármaco é por via extra-vascular), distribuição, biotransformação e excreção.

A **absorção**, primeira fase farmacocinética, pode ser definida como a passagem do fármaco de um meio externo do organismo para o sangue, que o conduzirá aos diferentes tecidos e órgãos.

Para que esse processo ocorra é necessário que o fármaco atravesse as membranas biológicas sob influência das características físico-químicas de ambos (WINTER, 1988).

O processo de absorção pode ser avaliado por quatro parâmetros farmacocinéticos obtidos através da construção de uma curva de sua concentração plasmática *versus* tempo: k_a (constante de absorção), C_{max} (concentração plasmática máxima), t_{max} (tempo de ocorrência da concentração plasmática máxima) e AUC (área sob a curva) (BOROUJERDI, 2002).

Uma vez ocorrida a absorção ou administração endovenosa, o fármaco distribui-se para outros compartimentos (WINTER, 1988).

A velocidade de **distribuição** sofre interferência de alguns fatores fisiológicos como fluxo sanguíneo e características das membranas, assim como das propriedades físico-químicas do fármaco que determinam a sua capacidade para atravessar as membranas e sua afinidade para ligar-se com proteínas plasmáticas. Quanto maior a afinidade e extensão de ligação com essas proteínas, menor o acesso desse fármaco a outros compartimentos do organismo.

O processo de distribuição de um fármaco pode ser quantificado, através do parâmetro volume de distribuição (V_d) que descreve a relação entre a quantidade do fármaco existente em todo o organismo e a quantidade existente no plasma, e conceitualmente se define como o volume no qual o fármaco deve estar contido para que a sua concentração se iguale a do plasma (WINTER, 1988).

Em farmacocinética clínica, o V_d é um importante parâmetro empregado para a construção do regime de dose que será utilizado no paciente. Em conjunto com a concentração alvo no estado de equilíbrio, o V_d pode ser utilizado para calcular a dose de ataque; para calcular a quantidade do fármaco no organismo em qualquer

momento desde que se obtenha uma concentração plasmática para estimar a viabilidade de utilizar-se a hemoperfusão ou hemodiálise para a remoção do fármaco do organismo (BJORNSSON, 1997).

Na **biotransformação** o fármaco é submetido a reações químicas, geralmente mediadas por enzimas, que o convertem em um ou mais compostos diferentes do originalmente administrado (metabólitos). As reações mais comuns da biotransformação de fármacos são: oxidação, redução, hidrólise e conjugação. Os metabólitos podem, por sua vez, também sofrer biotransformação. As reações de oxidação, redução e hidrólise são classificadas como de fase I, as de conjugação como de fase II do processo de biotransformação (WINTER, 1988).

Em geral, o fígado é o maior e algumas vezes o único sítio de biotransformação de fármacos; ocasionalmente o fármaco é biotransformado em outros tecidos como os rins, pele, pulmões, sangue e trato gastrointestinal.

Participam dessas reações uma série de enzimas não microssomais como a monoaminoxidase (MAO), de origem mitocondrial e esterases solúveis presentes no plasma; e enzimas microssomais que pertencem à superfamília de enzimas do CYP450 (WINTER, 1988).

O complexo enzimático CYP450 é o principal responsável pela biotransformação de fármacos no organismo humano, mais propriamente pelas reações de oxidação da fase I. Esse sistema, presente em maior quantidade e variabilidade no tecido hepático pode também ser encontrado nos pulmões, rins, bexiga e outros órgãos em menor quantidade. O CYP450 apresenta várias isoformas, que são formas múltiplas de uma mesma enzima que catalisam o mesmo tipo de reação com afinidades diferentes frente aos substratos. Além disso, as isoformas diferem na sua distribuição pelo organismo e na modulação de sua

atividade, apresentando diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores (WINTER, 1988).

No processo de biotransformação podem ser originados produtos farmacologicamente ativos, produtos inativos ou produtos dotados de significativa toxicidade. De maneira geral, esses produtos possuem maior hidrossolubilidade e, portanto, são mais facilmente eliminados pelo organismo.

Quando administrados pela via oral, os fármacos atingem o sistema porta hepático para chegar à circulação sistêmica, expondo a dose administrada aos sistemas enzimáticos. Se o fármaco sofre rápida e considerável biotransformação nessa primeira passagem pelo tecido hepático, somente pequena fração da dose administrada alcançará a circulação sistêmica (efeito de primeira passagem), levando à baixa biodisponibilidade (WINTER, 1988).

Os parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de biotransformação são: a constante de eliminação (K_{el}) e o clearance (Cl) (WINTER, 1988).

A meia vida ($t_{1/2}$) de eliminação é um parâmetro híbrido do clearance e do volume de distribuição e representa o tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco decline para a metade (ATHANI et al., 1990).

O parâmetro meia vida é útil para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, para prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever quanto tempo será necessário para atingir-se o estado de equilíbrio, e para prever quanto tempo será necessário para que uma dada concentração decline à outra concentração específica uma vez que não seja administrada nova dose (WINTER, 1988).

Para maioria dos fármacos utilizados na terapêutica, a biotransformação é um

processo essencial para a sua inativação e excreção renal. Apenas uma pequena parte das substâncias é eliminada do organismo de forma inalterada, alguns fármacos são excretados via bile e substâncias voláteis são excretadas pelos pulmões.

A **excreção** é a passagem do fármaco da circulação sangüínea para o meio externo, sendo os rins as principais vias de excreção dessas substâncias. Os mecanismos envolvidos na excreção renal são filtração glomerular, a secreção tubular ativa e a difusão passiva; sendo os dois primeiros os mais efetivos (WINTER, 1988).

Na presença de insuficiência renal, fármacos e metabólitos ativos excretados fundamentalmente pelos rins podem acumular-se, alterando-se os parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de eliminação: constante de eliminação (Kel) e clearance (Cl), com conseqüências sobre a meia vida do fármaco.

Clearance plasmático é um termo usado para indicar a remoção de determinada concentração de um composto contido em um volume específico de sangue na unidade de tempo. O clearance é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h), e compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo. Assim, a biotransformação hepática somada à excreção renal de um determinado fármaco levam ao que chamamos de depuração sistêmica total, ou clearance total.

$$Cl_{Total} = Cl_{renal} + Cl_{hepático} + Cl_{outros}^*$$

**refere-se a outras vias de excreção*

Quando o fármaco é parcial ou totalmente excretado pelos rins de forma inalterada, o clearance renal pode ser calculado dividindo-se a velocidade de excreção urinária (mg/min) pela sua concentração sangüínea (mg/mL).

Utilizando o parâmetro clearance podemos determinar a concentração plasmática média no estado de equilíbrio da administração de doses múltiplas, calcular a dose/tempo necessária para atingir determinada concentração plasmática média e fazer ajustes de dose para pacientes com hepatopatias ou nefropatias (WINTER, 1988).

3. Isoniazida, rifampicina e pirazinamida: farmacologia clínica

As associações medicamentosas são amplamente utilizadas na terapêutica, no entanto, as interações que podem ocorrer, como resultado dessas associações, nem sempre são satisfatoriamente elucidadas, de maneira a garantir a segurança dessa utilização.

Entre as associações clássicas de medicamentos, está aquela preconizada pelo Consenso sobre tuberculose do Ministério da Saúde de 1997 para o tratamento da tuberculose. A primeira fase do tratamento da tuberculose inclui o uso de isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PYR) nos primeiros dois meses de tratamento; na segunda fase há a retirada da pirazinamida, e associação da isoniazida e rifampicina, por um período de quatro meses. As doses utilizadas em pacientes que apresentam um peso corpóreo acima de 45kg correspondem a 400mg/dia para INH, 600mg/dia para RMP e 2000mg/dia para PYR. Esses fármacos, na forma farmacêutica de comprimido, são administrados diariamente. A associação medicamentosa adequada e seu uso, por tempo suficiente, são meios necessários para evitar a resistência e a persistência das micobactérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

Os efeitos adversos decorrentes da terapia medicamentosa da tuberculose são fatores importantes na dificuldade de adesão do paciente ao tratamento. Em

geral, a intolerância gastrointestinal, com sintomas de inapetência, náuseas, azia, dor epigástrica e abdominal são efeitos mais freqüentes (TANEJA & KAUR, 1990).

Esses sintomas estão associados ao desenvolvimento da hepatite decorrente do efeito tóxico da isoniazida (DOUGLAS & MCLEOD, 1999; TANEJA & KAUR, 1990). Os efeitos adversos sobre o fígado são de grande relevância na administração desse fármaco, ocorrendo elevação das enzimas séricas transaminase alanínica (ALT) e transaminase aspártica (AST), hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria e icterícia (DAVIES, 1998; CASTILLO et al., 1981).

Diversos mecanismos têm sido propostos para a elucidação da patogênese da hepatite induzida em humanos por INH (DAVIES, 1998). Entre esses, o de maior aceitação é aquele que propõe que o metabolismo da INH leva à formação de compostos hepatotóxicos (PERETTI et al., 1987a; TIMBRELL et al., 1980) e que a RMP, fármaco freqüentemente associado no tratamento da tuberculose e potente indutor do CYP450, aumenta a toxicidade da INH por aumento da produção desses metabólitos reativos (SHARMA, 2004; JENNER & ELLARD, 1989; GANGADHARAM, 1986; NODA et al., 1983).

A contribuição da PYR no desenvolvimento da hepatotoxicidade nas doses usuais tem sido controversa (SHARMA, 2004); alguns estudos afirmam que a PYR não possui atividade (PARTHASATHY et al., 1986). Entretanto em outros estudos foi observada contribuição significativa da PYR no desenvolvimento da hepatotoxicidade durante o tratamento em humanos com INH e RMP (YEE et al., 2003; DURAND et al., 1996).

Lenaerts et al. (2005) observaram aumento da atividade de ALT em animais tratados com PYR e RMP, entretanto os efeitos adversos relacionados à PYR

isoladamente permanecem desconhecidos, uma vez que o fármaco não foi administrado isoladamente.

Estima-se que 7 entre 9 pacientes tratados com INH, RMP e PYR apresentam sinais de hepatotoxicidade e que esse número decline para 1 em 9 pacientes no tratamento com a associação INH + RMP (DAVIES, 1998).

É realmente possível que a administração concomitante de fármacos, tais como a RMP e/ou PYR levem a diferenças na biotransformação da INH e assim, a diferenças no aparecimento na sua hepatotoxicidade.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo principal investigar a influência da PYR na farmacocinética e hepatotoxicidade induzida pela INH.

3.1. Isoniazida:

3.1.1. Mecanismo de ação:

A 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 síntese de ácidos graxos de cadeia longa (LEI et al., 2000).

A INH é utilizada tanto no tratamento profilático quanto na doença ativa da tuberculose. Sabe-se que a isoniazida, após ser absorvida, é metabolizada a ácido isonicotínico. Embora seu exato mecanismo de ação seja desconhecido (HARDMAN & LIMBIRD, 2004), há alguns propostos; entre estes a INH converte-se ao isocotinato, que funciona como antimetabólito do ácido isonicotínico. O isocotinato é incorporado ao NAD⁺ no lugar do ácido isonicotínico. O falso NAD⁺ não é capaz de catalisar as reações de oxi-redução normais (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 a ativação *in vivo* pela KatG, uma enzima com atividade de catalase e peroxidase (LEI et al., 2000; SHERMAN & STOVER, 1996).

3.1.2. Farmacocinética:

• Absorção

A INH é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal. Os picos das concentrações plasmáticas alcançam 3 a 5µg/mL após administração de doses habituais (de 5 a 20mg/Kg) (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; PELOQUIN et al., 1997) e são atingidos dentro de 1 a 2 horas após sua administração oral (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; DOUGLAS & MCLEOD, 1999).

A absorção e a biodisponibilidade são reduzidas quando a INH é administrada juntamente com alimentos (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; SELF et al., 1999) e antiácidos (HARDMAN & LIMBIRD, 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 INH atravessa a barreira placentária e é distribuída também no leite materno. Sua ligação com as proteínas plasmáticas é de aproximadamente 10-15% (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988). O volume de distribuição é de aproximadamente 0,6L/Kg em voluntários sadios com peso normal (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

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 plasmática (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

• **Biotransformação**

O metabolismo da INH (Figura 1) envolve uma etapa inicial de acetilação para formar acetil-isoniazida (AcINH), mediada pela N-acetiltransferase (KASHUBA et al., 1998). A etapa subsequente é a hidrólise, com liberação de ácido isonicotínico e acetil-hidrazina (AcHz). A AcHz pode sofrer acetilação originando diacetil-hidrazina (DAcHz) ou sofrer oxidação microsomal, mediada por isoformas do CYP, para originar metabólitos reativos com potencial hepatotóxico. A INH pode ainda, na etapa inicial do seu metabolismo, sofrer hidrólise direta para originar hidrazina (Hz), cuja oxidação resulta na formação de metabólitos hepatotóxicos (HUANG et al., 2003; DAVIES, 1998).

Segundo Wright & Timbrell (1978 apud PERETTI et al., 1987b) a INH inibe a acetilação da AcHz em animais; resultados semelhantes foram verificados por KARLAGANIS et al. (1987 apud PERETTI et al., 1987b) em humanos.

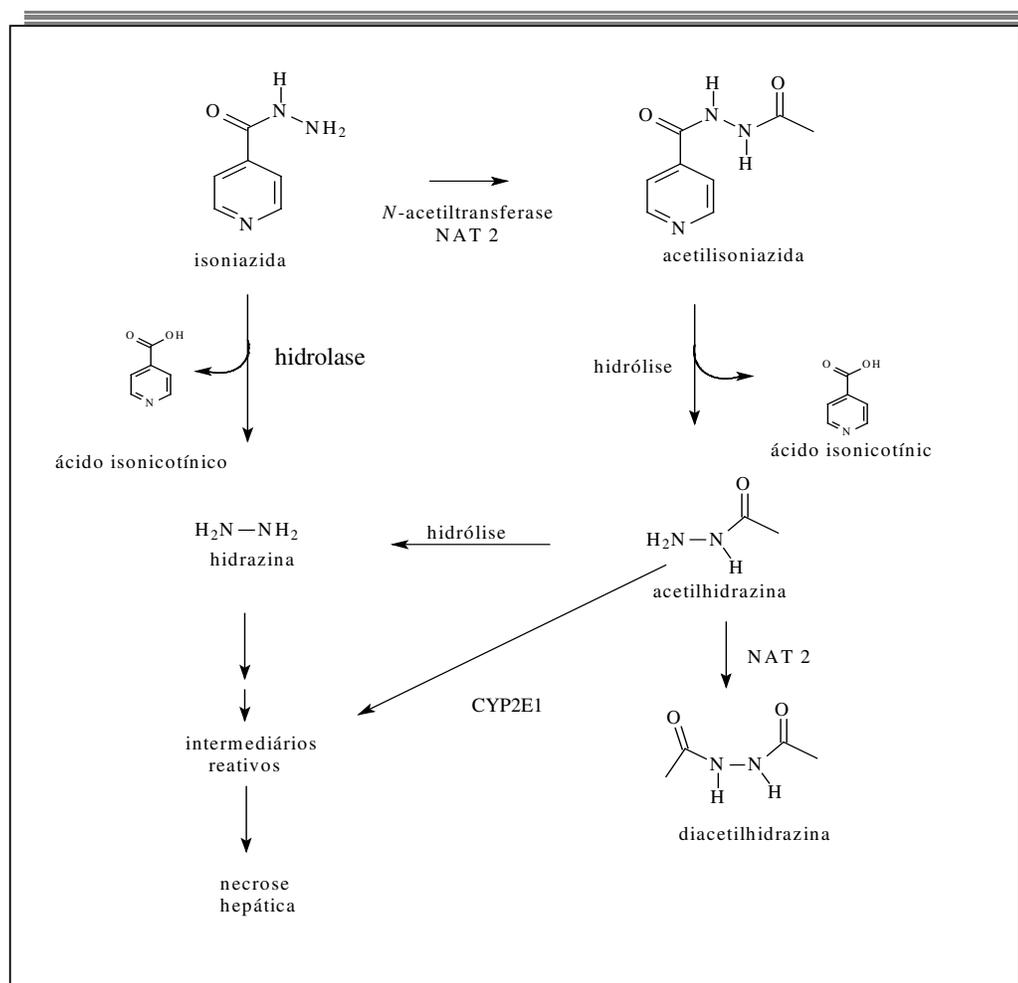


Figura 1. Biotransformação proposta da isoniazida e formação de intermediários hepatotóxicos (HUANG et al., 2003; DAVIES, 1998; MORIKE et al., 1996).

Existem evidências de efeito de primeira passagem após a administração oral de INH. 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 (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

É importante ressaltar que o metabolismo da INH é fundamentalmente dependente das reações de acetilação e oxidação e que a população humana apresenta fenótipo acetilador rápido e lento, distribuído heterogeneamente entre os diversos grupos raciais (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; DAVIES, 1998).

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. A concentração média plasmática nos acetiladores rápidos é de 30 a 50% daquela presente em acetiladores lentos. Foi sugerido que acetiladores rápidos apresentam uma resposta pobre ao tratamento quando comparados aos acetiladores lentos por essa razão (ELLARD, 1984).

Segundo Timbrell e colaboradores (1977) e Ellard & Gammon (1976) citados por Lauterburg et al. (1985), a meia vida plasmática da AcHz é 4,9 vezes maior que a meia vida da INH (GANGADHARAM, 1986; TIMBRELL et al., 1977 ; ELLARD & GAMMON, 1976) e a meia vida plasmática da DAchz também é maior, cerca de 8 vezes superior que a meia vida plasmática da INH (TIMBRELL et al., 1977).

• **Excreção**

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

Devido à atividade de NAT-2, acetiladores rápidos excretam significativamente mais AcINH e DAchz, enquanto que acetiladores lentos apresentam uma maior excreção de INH, AcHz e Hz, cujos metabólitos têm sido

relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade. A Hz provém da hidrólise da AcHz, e possivelmente da INH, como indicado por estudos com hepatócitos de ratos. A menor taxa de acetilação da INH e AcHz em acetiladores lentos favorece a hidrólise, e então a formação de Hz. Estes mecanismos podem explicar a maior excreção e um aumento na concentração plasmática de Hz relatada em acetiladores lentos (PERETTI et al., 1987b) e uma menor porcentagem de excreção de AcINH e DAchz (LAUTERBURG et al., 1985).

Quanto à excreção urinária, a maior parte da INH é biotransformada em acetil-isoniazida e ácido isonicotínico, os quais são excretados, na urina, dentro de 24 horas (DOUGLAS & MCLEOD, 1999). Pequenas quantidades do fármaco são excretadas através da saliva, escarro e em fezes (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

O clearance da INH é de aproximadamente 3,7 mL/min em acetiladores lentos e 7,4 mL/min em acetiladores rápidos (HARDMAN & LIMBIRD, 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 INH possui efeito inibitório sobre as isoformas CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19 e CYP3A4 alterando, da mesma forma, os parâmetros cinéticos de fármacos metabolizados por esses sistemas enzimáticos.

3.2. Rifampicina:

3.2.1. Mecanismo de ação:

A 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 estável fármaco-enzima, resultando em supressão do

início da formação da cadeia na síntese de RNA. São necessárias altas concentrações de RMP para que ela exerça sua ação bactericida sobre microorganismos intra e extracelulares. As micobactérias podem desenvolver rapidamente resistência à rifampicina, de modo que este antibiótico não deve ser utilizado isoladamente na quimioterapia da tuberculose (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

3.2.2. Farmacocinética:

• Absorção

A RMP tem uma biodisponibilidade oral de 90%. A administração oral de RMP produz concentrações plasmáticas máximas em 2 a 4 horas; após a administração de 600mg, este valor varia em torno de 7-12 µg/mL (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

• Distribuição

Após absorção no trato gastrintestinal, cerca de 80% do fármaco liga-se às proteínas plasmáticas (ACOCELLA, 1978).

A RMP distribui-se por todo o organismo, sendo encontrada em concentrações eficazes em muitos órgãos e líquidos corporais, como líquido céfalo raquidiano (SIPPEL et al., 1974 apud HARDMAN & LIMBIRD, 2004; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988). 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 and FARR, 1975 apud HARDMAN & LIMBIRD, 2004). O seu volume de distribuição aparente é de 1,6L/Kg.

• **Biotransformação**

Os principais metabólitos da RMP em humanos são a desacetil-rifampicina, a qual é formada por desacetilação e a formil-rifampicina, que é formada pela sua hidrólise (HOLDINESS, 1984; ACOCELLA, 1978). A desacetil-rifampicina retém praticamente toda a atividade antibacteriana (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Durante este período há desacetilação 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 (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

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 & Raymond (2006) verificaram em seus estudos que a administração concomitante de RMP+INH pode levar ao aumento da toxicidade causada pela INH devido à indução dessas isoformas do CYP450, que estão relacionadas com a conversão da AcHz, 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).

• **Excreção**

A RMP sofre rápida eliminação via bile, em consequência da circulação entero-hepática. A forma desacetilada é predominantemente encontrada na bile.

A meia vida de eliminação da RMP varia de 1,5 a 5 horas e aumenta na presença de disfunção hepática; porém pode estar reduzida em pacientes que recebem INH concomitantemente. A meia vida 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 (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

A RMP na forma inalterada e seu metabólito desacetil-rifampicina, ambos farmacologicamente ativos, são excretados primariamente na bile e posteriormente na urina enquanto que o metabólito formil-rifampicina tem excreção exclusivamente renal (ACOCELLA, 1978).

O clearance da RMP é de 8,7 ml/mim/Kg (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

3.3. Pirazinamida:

3.3.1. Mecanismo de ação:

A PYR apresenta atividade bactericida *in vitro* apenas em meio levemente ácido, porém desconhece-se o mecanismo de ação desse fármaco. Quando utilizada isoladamente verifica-se rápido desenvolvimento de resistência bacteriana (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

3.3.2. Farmacocinética:

• Absorção

A PYR é também rapidamente absorvida pelo trato gastrintestinal. Na administração oral de 1g observa-se concentrações plasmáticas de 45 µg/mL em 2 horas e 10 µg/mL em 15 horas (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

- **Distribuição**

Após a absorção, a PYR distribui-se amplamente por todo organismo, incluindo fígado, pulmões e fluido cérebro espinhal. Apresenta uma ligação às proteínas plasmáticas em torno de 10%. O volume de distribuição da PYR é de aproximadamente 0,7 L/Kg (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

- **Biotransformação**

No processo de metabolismo a hidrólise da PYR leva à produção de ácido pirazinóico que, novamente por processo de hidrólise, gera o ácido 5-hidroxipirazinóico, principal produto de excreção (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; JAIN et al., 1993).

- **Excreção**

A meia vida da PYR é cerca de 9,2 horas em pacientes com funções renal e hepática normais. Sua meia vida pode ser prolongada em pacientes com disfunção renal e hepática (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Aproximadamente 70% da dose do fármaco e seus metabólitos são excretados principalmente por filtração glomerular renal (JAIN et al., 1993). As concentrações urinárias atingem 50 a 100 mg/mL durante várias horas após uma dose única de 1g (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Vários estudos relatam que na administração concomitante de RMP e PYR pode ocorrer interação farmacocinética. Jain e colaboradores (1993) observaram diferenças nos parâmetros farmacocinéticos da RMP entre pacientes tratados com a tríade (INH+RMP+PYR), e pacientes tratados apenas com INH e RMP. A

administração concomitante de PYR em pacientes tratados com RMP produziu uma diminuição da área sob a curva (AUC) da RMP e um aumento do seu “clearance” (Cl).

Em estudo de dose única da associação RMP+INH ou RMP+INH+PYR, Jain e colaboradores (1993) observaram concentrações plasmáticas de RMP significativamente menores na presença de PYR. Singhal & Varshney (1989) observaram os efeitos da administração simultânea da INH sobre os parâmetros farmacocinéticos da PYR – diminuição da concentração máxima (C_{max}), aumento da meia vida (t_{1/2}), diminuição da constante de eliminação (K_{el}) e aumento do volume de distribuição (V_d); no entanto o perfil farmacocinético da INH na presença de PYR ainda não foi avaliado.

4. Hepatotoxicidade induzida por medicamentos

A biotransformação de fármacos pode resultar na formação de metabólitos reativos capazes de produzir danos celulares, e tem sido considerada como um importante processo da patogênese de algumas formas de hepatotoxicidade.

As reações de Fase I ocorrem principalmente no retículo endoplasmático liso (REL) do hepatócito e são mediadas pelo complexo enzimático CYP450.

Estima-se que o CYP450 apresente de 20 a 200 isoformas, sendo as mais importantes para a biotransformação de fármacos: CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2 E CYP2E1 (DAVIES, 1998).

Em geral, a maioria dos metabólitos reativos relacionados ao desenvolvimento de danos hepáticos são originados a partir de reações de Fase I (DAVIES, 1998).

O tecido hepático, dado o conteúdo de sistemas enzimáticos presentes, é o principal sítio de biotransformação de fármacos e mais susceptível aos efeitos tóxicos desses metabólitos reativos (ZIMMERMAN & ISHAK, 1987).

A intensidade dos efeitos tóxicos depende de vários fatores, tais como velocidade de formação de metabólitos reativos e existência de mecanismos de defesa e reparação. O uso concomitante de fármacos pode levar a alterações significativas na produção de metabólitos uma vez que ocorra interações na fase de biotransformação, e assim o efeito tóxico decorrente do uso de uma associação medicamentosa pode ser diferente daquele observado quando há administração do fármaco isoladamente. Idade, sexo, peso corpóreo, espécie animal, ingestão crônica de álcool e presença de hepatopatia são alguns outros fatores que podem determinar diferenças na capacidade de biotransformação de determinado fármaco, desde que o sistema enzimático envolvido, em cada circunstância, apresente características diferenciadas (MADDREY, 2005; MEIER et al, 2005; HUANG et al, 2003; KUNIMOTO et al, 2003).

O uso terapêutico da INH é associado à hepatotoxicidade (LEE, 2003; ATTRI et al., 2000; TIMBRELL, 1979). Diversos autores reportam a hepatotoxicidade como o efeito adverso mais grave da INH, com ocorrência em 16 a 20% dos adultos jovens que recebem o fármaco (WALUBO et al., 1998). 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 aumenta com a idade (TIMBRELL, 1979). Os pacientes em tratamento com INH necessitam de acompanhamento laboratorial contínuo, realizando testes para a avaliação da função

hepática e, apesar do controle realizado através da análise de parâmetros bioquímicos, diversas fatalidades associadas à hepatotoxicidade da droga têm sido documentadas, provavelmente devido à imprevisibilidade do dano e à ausência de tratamento eficaz (WALUBO et al., 1998). Existem, ainda, dificuldades na realização do diagnóstico dos efeitos tóxicos decorrentes do uso da INH devido às características indistintas das alterações bioquímicas, patológicas e morfológicas dos efeitos tóxicos das hepatites viral e alcoólica. Além disso, as teorias da hepatotoxicidade pela INH ainda são inconclusivas (HUANG et al., 2003; WALUBO et al., 1998).

A patogênese da hepatite induzida pela INH tem sido estudada por vários autores (ATTRI et al., 2000; DAVIES, 1998; CASTILLO et al., 1981); e a hipótese de maior relevância aponta que no metabolismo do fármaco são formados compostos hepatotóxicos, seja pela via de acetilação (NAT-2) ou pela via de CYP450 (MADDREY, 2005; GILLESPIE, 2004; SNOUDGRASS et al., 1974 apud SARICH et al., 1995). Outros autores afirmam que a associação da INH com RMP leva ao aumento da formação desses metabólitos (ATTRI et al., 2000; TANEJA & KAUR, 1990; GANGADHARAM, 1986; NODA et al., 1983; BAHRI et al., 1981; TIMBRELL et al., 1980; TIMBRELL et al., 1977).

Estudos realizados por Noda e colaboradores (1983) demonstraram que um grupo de animais que recebeu doses diárias de INH, tendo sido pré tratados com RMP, apresentou maior dano hepático que os animais do grupo controle devido à indução do CYP450 pela RMP (NODA et al., 1983).

Evidências sugerem que a AcHz é o metabólito responsável pela hepatotoxicidade, produzido em maior quantidade pelos acetiladores rápidos (MITCHELL et al., 1976 apud TIMBRELL et al., 1977). Timbrell (1979) verificou que

em indivíduos com fenótipo acetilador rápido ou lento há excreção de quantidades semelhantes desse metabólito. Porém, na excreção de DAChz observam-se diferenças entre os diferentes fenótipos acetiladores. Então acetiladores rápidos excretam quantidades significativamente maiores de DAChz do que acetiladores lentos, o que promove, portanto, uma efetiva diminuição da Achz disponível no organismo. Entretanto, há indícios de que a toxicidade está mais intimamente relacionada à quantidade de Achz metabolizada pelas enzimas microssomais do que com a quantidade deste metabólito excretada na urina (TIMBRELL, 1979). Segundo Maddrey et al. (2005), os metabólitos responsáveis pelo dano hepático são a Hz e os derivados monoacetilados.

Alguns estudos demonstram uma relação possível entre a susceptibilidade à hepatotoxicidade e o fenótipo acetilador do paciente (OHNO et al., 2000; CASTILLO et al., 1981).

Se existe relação entre a acetilação da INH e o efeito hepatotóxico é realmente possível que o dano hepático sofra interferência do genótipo humano (TIMBRELL, 1979).

Muitos estudos indicam que não somente as concentrações de INH, mas também a eficácia e toxicidade da INH estão relacionadas à atividade da enzima NAT-2 (KINZIG-SHIPPER et al., 2005).

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 INH sofra interferência da etnia (KASHUBA et al., 1998).

A mais importante questão é como as diferenças da exposição da INH nos indivíduos geneticamente diferentes podem alterar a eficácia e toxicidade da INH,

especialmente no caso de toxicidade dose-dependente como os efeitos neurológicos e desordens hepáticas observadas na administração da INH (KINZIG-SHIPPER et al., 2005).

Na hepatotoxicidade, o efeito adverso mais relevante da INH, ocorre em aproximadamente 10% de todos os pacientes que recebem doses usuais do fármaco. Segundo Kinzig-Shippers et al. (2005), os acetiladores lentos apresentam maior risco de desenvolver hepatotoxicidade comparado ao acetiladores rápidos.

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

Peretti e colaboradores (1987b) 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 AcINH que originará, por hidrólise, o ácido isonicotínico e AcHz. Os acetiladores lentos promovem preferencialmente a hidrólise da INH com formação de ácido isonicotínico e Hz (TIMBRELL, 1979). Segundo Huang e colaboradores (2003), a oxidação da AcHz é intermediada pela isoforma CYP2E1, a principal enzima responsável pela formação de compostos hepatotóxicos resultantes do metabolismo da INH.

Em seu trabalho, Peretti et al. (1987b) conclui que altas concentrações de INH promovem saturação do processo de acetilação. Essa saturação pode contribuir, especialmente nos acetiladores lentos, para o acúmulo de AcHz, 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, assim como os fatores idade, consumo crônico de álcool e drogas indutoras do sistema microsomal hepático, como a RMP, utilizada concomitantemente no tratamento da tuberculose (LAUTERBURG et al., 1985).

Estudos epidemiológicos sugerem que pacientes que utilizam simultaneamente etanol ou drogas indutoras das enzimas hepáticas são mais susceptíveis aos danos hepáticos decorrentes da administração de INH, devido à maior formação de AcHz (HUANG et al., 2003).

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

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 AcHz e INH para a reação. Contrapondo as observações de Zuber e colaboradores (2002), Huang e colaboradores (2003) verificam que a INH apresenta um efeito inibitório na atividade da CYP2E1 no tratamento contínuo.

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

Assim, existem evidências de que a ação de enzimas microssomais sobre a AcHz e Hz seja também responsável pela hepatotoxicidade. 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, 1979).

Diante do exposto, consideramos que a administração concomitante de fármacos, tais como a RMP e PYR levam a diferenças no metabolismo da INH e, então a diferenças no aparecimento dos efeitos hepatotóxicos.

Para a avaliação da hepatotoxicidade em animais têm sido utilizados critérios tais como aparecimento de necrose tissular e inflamação intralobular do fígado no exame histopatológico e níveis séricos das transaminases três vezes superiores aos estabelecidos como referência (RAVINDEL et al., 2006; ATTRI et al., 2000; BAHRI et al., 1981) e os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para

classificar o grau de hepatotoxicidade induzida por fármacos: grau 1 ALT - 51-125UI/L ou 1,25-2 vezes superior ao valor basal; grau 2 ALT - 126-250UI/L ou 2,6-5 vezes superior ao valor basal; grau 3 ALT - 251-500UI/L ou 5,1-10 vezes superior ao valor basal; grau 4 ALT - >500UI/L ou 10 vezes superior ao valor basal (LENAERTS et al., 2005).

Elevações dos níveis de aminotransferases aparecem dentro de várias semanas após o início do tratamento com INH em 10-20% dos pacientes. Usualmente essas elevações são moderadas e não estão associadas a sinais e sintomas sugestivos de dano hepático. Em muitos pacientes, o uso continuado de INH é bem tolerado e freqüentemente os níveis das aminotransferases retornam ao normal (MADDREY, 2005).

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.

Já a fisiopatologia da hepatotoxicidade relacionada à associação RMP+PYR não está totalmente elucidada, mas há suspeitas que a PYR seja o problema primário. A hepatotoxicidade associada à PYR tende a ocorrer durante o segundo mês de tratamento, enquanto que associada à INH ocorre predominantemente durante o primeiro mês de terapia. A hepatotoxicidade associada somente à INH é rapidamente reversível quando há a retirada da droga, porém a hepatotoxicidade associada à PYR é lentamente reversível e pode resultar em deficiência hepática, mesmo após a descontinuidade da droga (KUNIMOTO et al., 2003).

Um total de 5,9% dos pacientes que realizaram a terapia incluindo INH+RMP+PYR desenvolveram hepatotoxicidade, enquanto que somente 3,9% que receberam RMP+PYR apresentaram o mesmo efeito (KUNIMOTO et al., 2003).

Alguns autores demonstraram o efeito inibitório da PYR sobre o CYP450 e outras enzimas como hidroxilase, p-nitroanisol O-demetilase e aminopirina demetilase (NISHIMURA et al., 2004); para CYP2E1 tem sido documentado um efeito bifásico (indução e inibição) por INH (DESTA et al., 2001; FACINO et al., 1980 apud NISHIMURA et al., 2004).

Considerando a importância do metabolismo da INH no desenvolvimento da hepatotoxicidade e a probabilidade de interação farmacocinética com a PYR nessa associação medicamentosa, é possível que a associação resulte em diferente perfil de hepatotoxicidade.

O presente trabalho visa avaliar os efeitos da administração simultânea de PYR sobre os parâmetros farmacocinéticos da INH e a produção de seus metabólitos, em um grupo de animais sob tratamento com INH+PYR e outro com INH+RMP+PYR, conforme estabelecido pelo Consenso sobre tuberculose do Ministério da Saúde para tratamento da tuberculose, bem como o comportamento de biomarcadores de hepatotoxicidade: as transaminases AST e ALT.

2. OBJETIVOS

- i) Desenvolver, padronizar e validar um método analítico por HPLC para a determinação simultânea da INH e seus metabólitos em soro.
- ii) Investigar a disposição cinética da INH e seus metabólitos em animais tratados com doses múltiplas deste fármaco e comparar os parâmetros farmacocinéticos com os obtidos no tratamento com doses múltiplas da INH associada à PYR e na associação clássica INH + RMP + PYR.
- iii) Investigar o comportamento da atividade das transaminases séricas ALT e AST nos animais tratados em ii) e compará-lo a animais tratados com doses múltiplas de PYR e ao grupo controle (tratado com água estéril).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram utilizados ratos Wistar, com peso médio de $250\text{g} \pm 10$, 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) e obtiveram alimento e água a vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

Foram utilizados um total de 190 animais distribuídos nos seguintes grupos:

- **Grupo I** - tratados com INH (n = 50);
- **Grupo II** - tratados com INH + PYR (n = 50);
- **Grupo III** - tratados com INH + RMP + PYR (n = 50);
- **Grupo IV** - tratados com PYR (n = 20);
- **Grupo V controle** – animais tratados com água estéril (n = 20).

Foram excluídos do estudo os animais para os quais foram obtidos valores bioquímicos basais (AST, ALT) fora do intervalo de referência (MORI, 2002).

3.2. Protocolo Experimental:

Os animais receberam por gavagem, diariamente, por um período de 21 dias:

Grupo I: INH (100mg/Kg/dia);

Grupo II: INH (100mg/Kg/dia) +PYR (350mg/Kg/dia);

Grupo III: INH (100mg/Kg/dia) +RMP (100mg/Kg/dia) +PYR (350mg/Kg/dia);

Grupo IV: PYR (350mg/Kg/dia);

Grupo V: água estéril.

As doses de INH e RMP utilizadas no presente trabalho foram aquelas utilizadas por Yue et al. (2004) e a dose de PYR foi determinada considerando-se a proporção das doses utilizadas no Consenso sobre Tuberculose.

As soluções dos fármacos foram preparadas em água estéril, diariamente e as administrações realizadas no período da manhã (8h), num volume de 1mL. Uma vez que o tratamento usual da tuberculose envolve a administração oral dos fármacos, optamos pela administração via gavagem em nosso experimento.

Foi realizada a determinação da atividade das enzimas ALT e AST nos tempos zero (anteriormente ao início do tratamento), e ao final do vigésimo primeiro dia de experimento, sendo a primeira coleta realizada pela cauda e a segunda obtida por decapitação dos animais.

Para os animais que receberam INH (grupo I, grupo II e grupo III) foi realizada coleta de material biológico para a determinação sérica da isoniazida e de seus metabólitos, construindo-se a curva de *concentração plasmática x tempo*. Amostras seriadas de sangue foram coletadas em 10 tempos diferentes (0; 15'; 30'; 45'; 60'; 90'; 3h; 6h; 12h e 24h); para cada tempo de coleta foram empregados 5 ratos.

As amostras de sangue obtidas da cauda e por decapitação dos animais foram colhidas, respectivamente, em eppendorfs e tubos de vidro sem a presença de anticoagulante para obtenção de soro. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm, por 10 minutos e o soro utilizado para as análises laboratoriais.

3.3. Métodos Analíticos

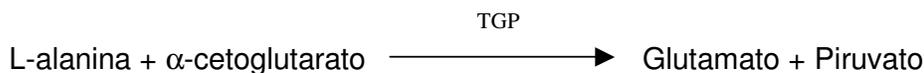
3.3.1. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos ALT e AST

Foram realizados testes bioquímicos para a determinação de ALT e AST por método colorimétrico pela reação de Reitman-Frankel (BURTIS & ASHWOOD, 2001), Kit Labtest (ref.:181104), cujas etapas estão descritos abaixo:

⇒ Aspartato Aminotransferases (AST ou TGO)- a transaminase oxalacética promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



⇒ Alanina Aminotransferase (ALT ou TGP)- a transaminase pirúvica promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



O piruvato e/ou oxalacetato formados reagem com a 2,4-dinitrofenilhidrazina com formação da hidrazona correspondente que absorve luz à 505nm, em meio alcalino.

3.3.2. Determinação da INH e seus metabólitos em soro

A análise de INH 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).

3.3.2.1. Reagentes, Solventes e Soluções

Padrões de INH, RMP e PYR foram cedidos pela Fundação do Remédio Popular (FURP); hidrazina monohidratada 99% e acetil-hidrazina 95% (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA); acetil-isoniazida 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 (TCA) são provenientes da Labsynth (São Paulo, Brasil) e o cinamaldeído da Merck (Alemanha). Os solventes acetonitrila e isopropanol empregados na fase móvel do sistema cromatográfico foram obtidos da J. T. Baker (USA), grau HPLC.

O tampão fosfato foi preparado a uma concentração de 0,05M e empregado como um solvente da fase móvel; o TCA foi preparado a 10%, em água, com a finalidade de desproteinização; o cinamaldeído foi preparado a 1%, em metanol, utilizado para o processo de derivatização da INH e Hz e o ácido clorídrico foi preparado a uma concentração de 6M, responsável pela hidrólise dos compostos acetilados.

Foram preparadas soluções 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.

3.3.2.2. Sistema Cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida (HPLC) Waters Alliance equipado com detector UV-VS 2487, operando a 340 nm, coluna Resolve TM C₁₈ (5 µm, 90 A, 3,9 mm x 300 mm), pré-coluna RP-18 Symmetry®, Waters®, com injetor automático. A fase móvel foi constituída pelos solventes isopropanol (A), acetonitrila (B) e tampão fosfato de potássio monobásico 0,05M (C) em modo gradiente (início e término nas proporções de 8% de A; 32% de B e 60% de C (Tabela 1), com fluxo de 1 mL/min.

Tabela 1 – 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
22	8	32	60

3.4. Procedimento Analítico (Figura 2)

• Derivatização

Alíquotas de soro (300 μ L) foram adicionadas de TCA 10% (300 μ L), agitadas em vortex e centrifugadas a 2500 rpm, por 10 minutos, para precipitação das proteínas.

Posteriormente foram adicionados ao sobrenadante 30 μ L de água, 60 μ L de CA 1% (em metanol), para análise de INH e Hz; enquanto que, para análise dos compostos acetilados (AcINH e AcHz) foram adicionados ao sobrenadante 30 μ L de HCl 6M, incubando-se por 1 hora a 80°C e em seguida adicionou-se 60 μ L de CA 1% (em metanol). As amostras foram agitadas em vortex e repousaram a temperatura ambiente por 10 minutos seguindo-se a injeção de 50 μ L no sistema cromatográfico.

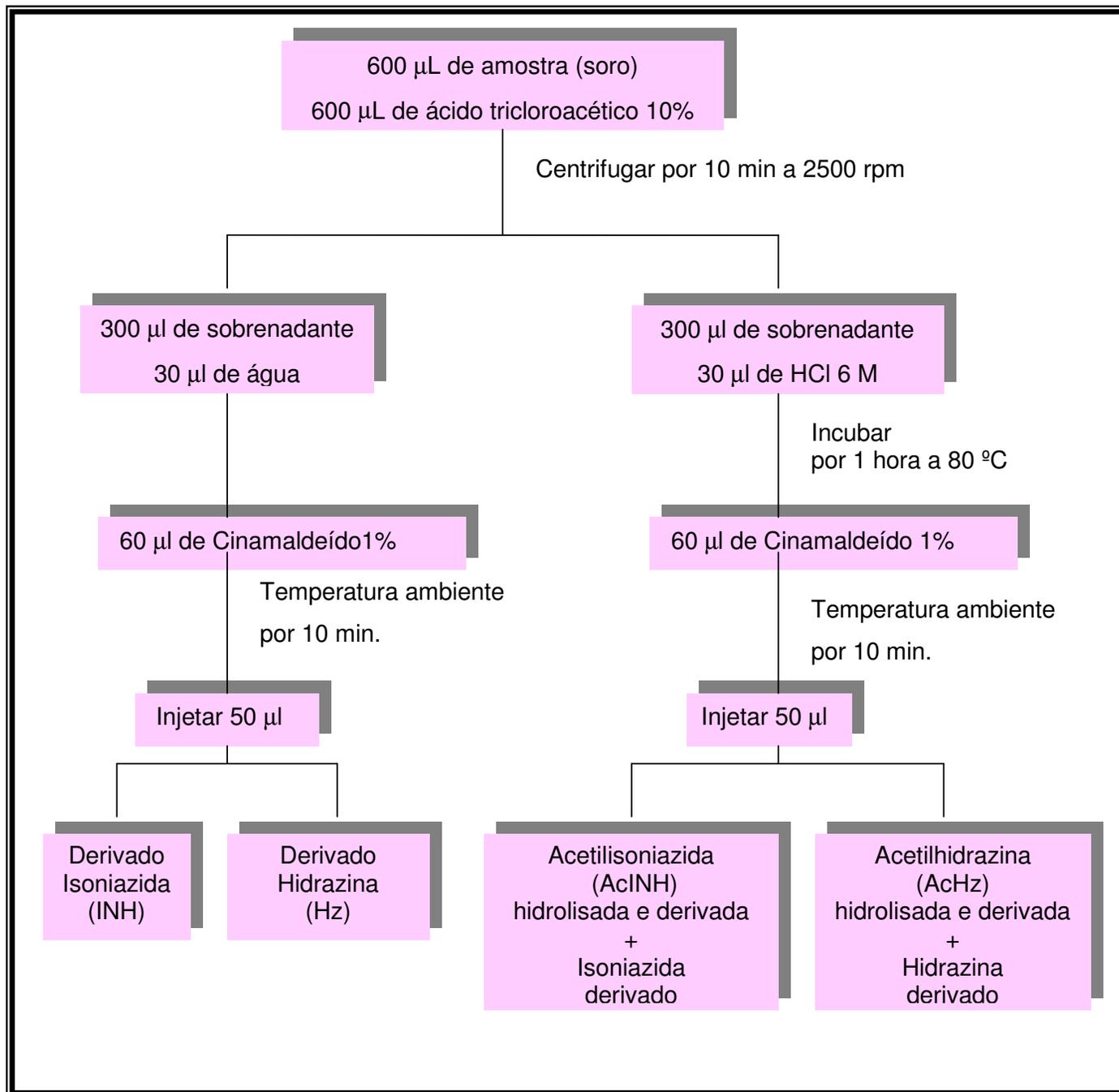


Figura 2 – Fluxograma para a determinação de INH, Hz e compostos acetilados em soro (SEIFART, 1995).

3.4.1. Curvas de calibração

Alíquotas de soro coletadas de diferentes voluntários (n=6) foram inicialmente testadas para a verificação de picos interferentes nos tempos de retenção próximos aos dos derivados de INH e Hz. O soro humano pôde ser utilizado para análises da validação por não apresentar diferenças em relação ao soro de ratos no sistema cromatográfico utilizado.

Alíquotas de 990 μL de soro, em triplicata, foram enriquecidas com 10 μL de cada solução diluída de INH e AcINH para alcançar as concentrações finais: 0,78; 1,562; 3,125; 6,25; 12; 25; 37,5 e 50 $\mu\text{g/mL}$, de Hz: 50, 100, 150, 200, 300 e 400 ng/mL e AcHz: 70, 100, 150, 200, 300 e 400 ng/mL e derivatizadas conforme descrito no item 3.4. Na construção da curva de calibração da INH, realizaram-se os dois processos de derivatização, na presença e ausência de hidrólise, considerando-se que há perda de INH durante o processo de hidrólise com HCl 6 M.

As curvas de calibração foram construídas projetando-se no eixo das ordenadas a área do pico dos derivados e no eixo das abcissas as concentrações (C) de INH e AcINH ($\mu\text{g/mL}$) e Hz e AcHz (ng/mL).

3.4.1a. Cálculos da concentração de AcINH em amostras biológicas

Para calcularmos a concentração da AcINH a partir do método anteriormente descrito é necessário considerarmos a existência de INH na amostra e que o processo de hidrólise levará a uma formação adicional de INH a partir da AcINH existente na mesma amostra.

Calculamos, então, a concentração de INH na amostra a partir do processamento pela via sem hidrólise. Processamos outra alíquota da mesma

amostra pela via com hidrólise, e obtemos INH a partir da hidrólise da AcINH que se somará à INH pré existente.

Do valor total da INH obtida pela rota com hidrólise; subtraímos a concentração da INH da amostra obtida no processamento pela rota sem hidrólise.

O valor final obtido deve ser multiplicado por 1,3065, considerando o fator de equimolaridade entre INH e AcINH.

É importante ressaltar que para o cálculo inicial de INH total da amostra processada pela via com hidrólise utilizamos uma curva de calibração de INH submetida ao processo de hidrólise devido às perdas observadas durante o processo.

A equação abaixo foi construída a partir do trabalho realizado por Seifart e colaboradores (1995) e utilizada para os cálculos de concentração de AcINH das amostras.

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

Legenda:

- Área dAcINH: área do derivado de AcINH obtida pela análise da amostra – via com hidrólise.
- Conc. INH: concentração de INH na amostra pertinente analisada pela via sem hidrólise.
- algarismos em verde: curva da INH com hidrólise.
- algarismos em azul: curva da AcINH.

3.4.1b. Cálculos da concentração de AcHz em amostras biológicas

Para calcularmos a concentração da AcHz a partir do método anteriormente descrito é necessário considerarmos a existência de Hz na amostra e que o processo de hidrólise levará a uma formação adicional de Hz a partir da AcHz existente na mesma amostra.

Calculamos, então, a concentração de Hz na amostra a partir do processamento pela via sem hidrólise. Processamos outra alíquota da mesma amostra pela via com hidrólise, e obtemos Hz a partir da hidrólise da AcHz que se somará à Hz pré existente.

Do valor total da Hz obtida pela rota com hidrólise; subtraímos a concentração da Hz da amostra obtida no processamento pela rota sem hidrólise.

O valor final obtido deve ser multiplicado por 2,3118, considerando o fator de equimolaridade entre Hz e AcHz.

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

Legenda:

- Conc. AcHz: concentração de AcHz na amostra analisada pela via com hidrólise.
- Área dAcHz: área do derivado de AcHz obtida pela análise da amostra – via com hidrólise.
- Algarismos em verde: curva da AcHz.
- Conc. Hz: concentração de Hz.

3.4.2. Validação

O processo de validação incluiu os procedimentos necessários para a determinação dos limites de confiança do método, de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (RESOLUÇÃO-RE nº899, de 29 de maio de 2003). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se o método analítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos de farmacocinética da INH e metabólitos.

3.4.2.1. Linearidade

A linearidade foi estudada através da análise de amostras de soro adicionadas de concentrações maiores de INH, AcINH, Hz e AcHz do que aquelas utilizadas na construção da curva 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 0,78 a 75 µg/mL para INH e AcINH, de 40 a 800 ng/mL para Hz e de 60 a 800 ng/mL para AcHz.

3.4.2.2. Limite de Detecção

O limite de detecção foi determinado como a menor concentração detectada, cuja área da concentração mínima detectada corresponde a 3x o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 3 replicatas.

3.4.2.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração quantificada, cuja área da concentração mínima quantificada corresponde a 5x o

valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 3 replicatas.

3.4.2.4. 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 INH (1, 10 e 40 µg/mL), AcINH (5, 15 e 30µg/mL), Hz (75, 150 e 300ng/mL) e AcHz (100, 200 e 300 ng/mL), 5 replicatas durante 5 dias consecutivos (inter ensaios) e em 10 replicatas num mesmo ensaio (intra-ensaio), com coeficiente de variação menor que 15%. A exatidão (%erro sistemático) foi obtida através da avaliação da concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores reais dos compostos na amostra, com coeficiente de variação menor que 15%.

3.4.2.5. Estabilidade

O ensaio de estabilidade tem como finalidade verificar se a concentração da substância sofre alterações após um período específico de armazenamento pré-processamento laboratorial (CHANG, 2002).

As estabilidades dos analitos foram determinadas em curta e média duração. Alíquotas foram preparadas em três concentrações diferentes, baixa, média e alta. Para INH e AcINH foram empregadas as concentrações de 1, 10 e 40 µg/mL, e para Hz e AcHz concentrações de 40, 150 e 300 ng/mL, em 5 replicatas.

Estabilidade de curta duração:

A estabilidade do analito foi determinada após três ciclos de congelamento e descongelamento. As alíquotas foram estocadas a uma temperatura de -20°C por

24h e descongeladas espontaneamente, a temperatura ambiente, passando por todo processo de derivatização como descrito anteriormente para posterior análise. Tal procedimento foi realizado por 3 dias consecutivos, sob as mesmas condições.

Estabilidade de média duração:

A estabilidade do analito foi analisada nos tempos zero, um, dois, quatro, oito e vinte um dias de armazenamento, passando por todo processo de congelamento, descongelamento e derivação, sob as mesmas condições.

3.4.2.6. Seletividade

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na região de interesse quando os fármacos rifampicina, etambutol, pirazinamida, ácido acetil salicílico, cafeína, ranitidina, loratadina e alopurinol foram submetidos ao procedimento de análise aqui empregado (Tabela 2). Deve-se lembrar que estes fármacos foram escolhidos devido ao fato de serem rotineiramente empregados contra os efeitos adversos do tratamento anti-tuberculose e apresentarem grande importância nos estudos clínicos.

Tabela 2- Estudo da seletividade do método de análise dos derivados de INH e Hz em soro.

Fármaco	Concentração (ug/ml)	Rt (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)

Estes resultados indicam que o método analítico no presente trabalho pode ser também aplicado em estudos clínicos, e não somente em amostras controladas como a de animais de experimentação.

3.5. Análise Farmacocinética

A disposição cinética da INH, AcINH, Achz e Hz foi avaliada após a administração de 100mg/Kg/dia de INH por um período de 21 dias. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas *curvas concentração plasmática x tempo*.

As meias vidas e as constantes de velocidade (absorção, distribuição, eliminação) foram determinadas pelo modelo bicompartimental, 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 de *concentração plasmática x tempo* (AUC^{0-24}) foram calculadas através do método dos trapezóides. Para a INH, AUC foi utilizado nos cálculos do clearance total aparente ($Cl/f = \text{dose}/AUC$) e do volume aparente de distribuição ($Vd/f = Cl/f/\beta$).

Foram calculadas as relações AUC_{HZ}/AUC_{INH} ; AUC_{AcINH}/AUC_{INH} ; AUC_{AcHZ}/AUC_{AcINH} e AUC_{HZ}/AUC_{AcHZ} em cada grupo para verificar se houve diferenças na produção dos metabólitos.

A concentração plasmática média no estado de equilíbrio ($C_{p_{ss}}$) foi calculada com base na equação $C_{p_{ss}} = AUC/\tau$

Parâmetro	Método para obtenção
AUC⁰⁻²⁴	Trapezóides
Ka	$0.693/t_{1/2}^a$
T_{1/2} a	Resíduos
K α	$0.693/t_{1/2}^a$
T_{1/2} α	Resíduos
Vd/f (L)	$Cl/f/\beta$
Cl_T / f (L/h)	Dose/AUC
T ½ (h)	Gráfico
β (h⁻¹)	$0.693/t_{1/2}$
Cp_{ss}	AUC/τ

3.6. Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através das médias e erro padrão da média (EPM). A comparação dos parâmetros farmacocinéticos para INH, Hz, AcINH, AcHz e os perfis farmacocinéticos dos metabólitos foram comparados através da aplicação do teste de Tukey. 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®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de INH e metabólitos

O estudo da disposição cinética de fármacos e seus metabólitos requer disponibilidade de métodos analíticos com sensibilidade e especificidade compatíveis com as suas concentrações plasmáticas, observadas na administração de doses únicas ou múltiplas.

A determinação da INH e seus metabólitos em plasma humano ou em animais de experimentação é descrita por vários autores (KHUHAWAR & RIND, 2002; SADEG et al., 1996; SEIFART et al., 1995; KOHNO et al., 1991; LACROIX et al., 1984; HUTCHINGS et al., 1983), que utilizam a formação de derivados empregando 2-fluoreno-carboxialdeído (KHUHAWAR & RIND, 2002), cinamaldeído (SEIFART et al., 1995) e m-clorobenzoil (KHUHAWAR & RIND, 2002), separados em colunas convencionais de fase reversa e analisados por HPLC com detecção por ultravioleta (SEIFART et al., 1995).

A derivatização da INH e metabólitos com CA 1%, no presente trabalho, resultou na formação de derivados separados por HPLC.

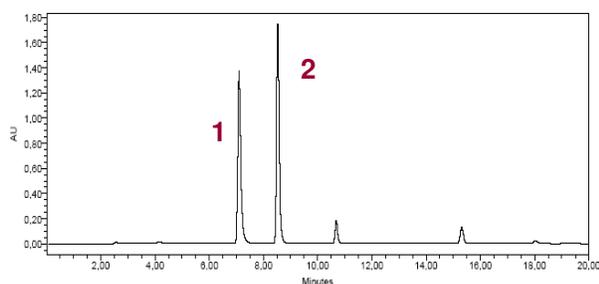


Figura 3A - (1) INH - 50 ug/ml; (2) CA.

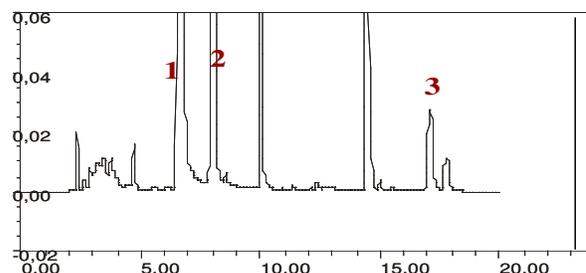


Figura 3B - (1) INH - 50 ug/ml; (2) CA; (3) Hz - 200 ng/mL

Figura 3. Cromatograma do derivado de INH (A) e de Hz (B) realizado com coluna de fase reversa C₁₈ e detecção por UV. As figuras 3A e 3B correspondem ao mesmo cromatograma, porém em escalas distintas.

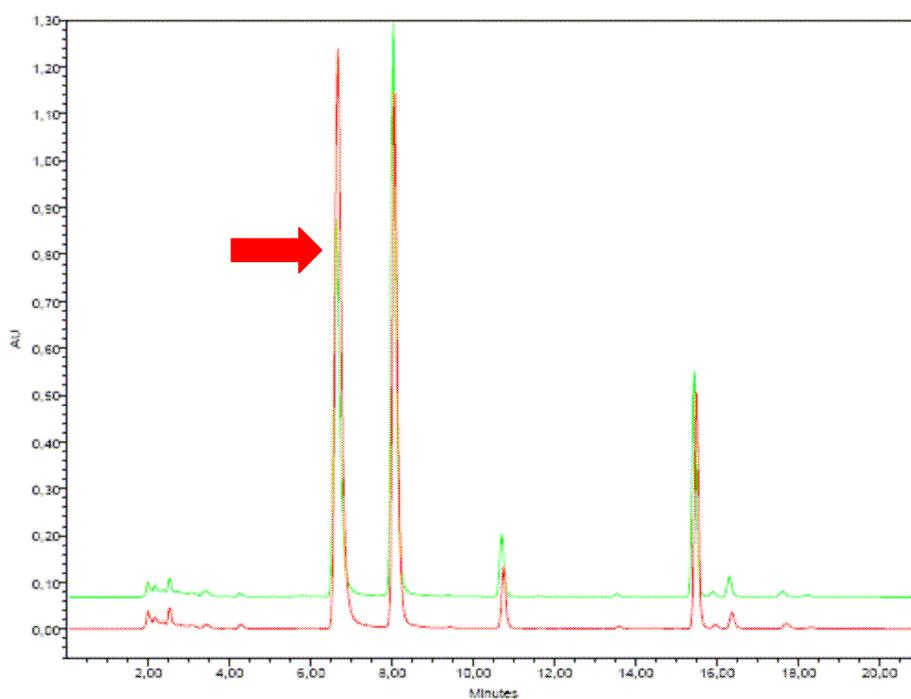


Figura 4 - — Amostra do grupo Tríade sem hidrólise (rato 12) – tempo 45'
 — Amostra do grupo Tríade sem hidrólise (rato 14) – tempo 60'

A Figura 4 mostra o aumento da concentração plasmática da INH no grupo Tríade com o decorrer do tempo, entre 45' e 60', após administração da tríade.

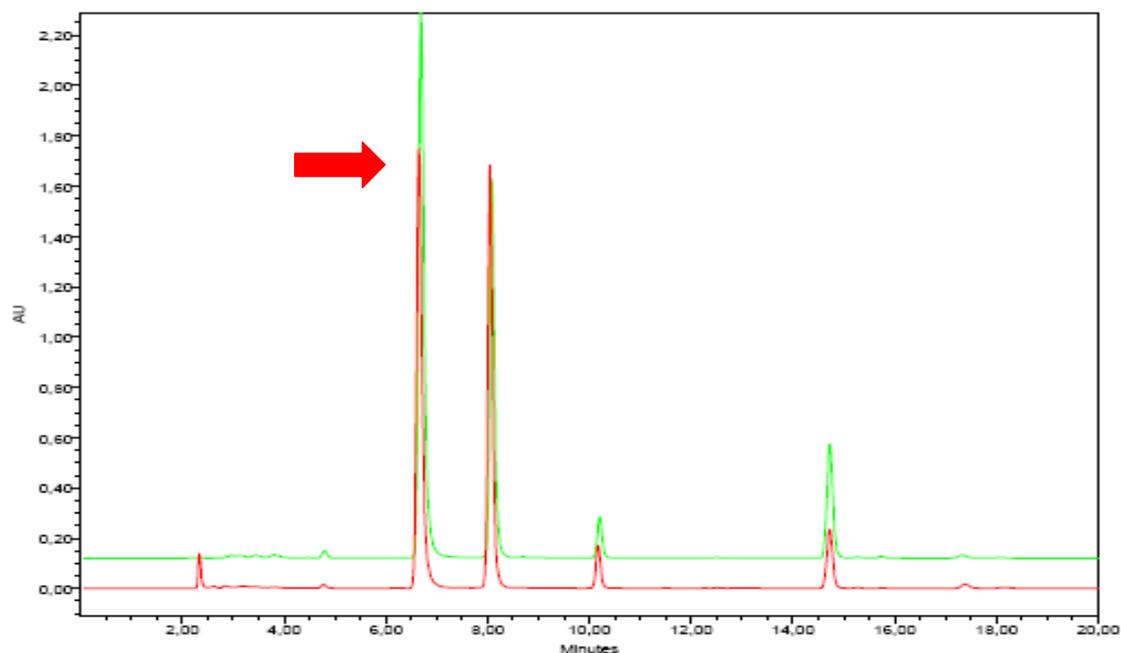


Figura 5 - — Amostra do grupo INH isolada com hidrólise – tempo 30'
 — Amostra do grupo INH isolada sem hidrólise – tempo 30'

Pode-se observar na Figura 5 que o processo de hidrólise da INH promove a perda do fármaco, ou seja, há uma diminuição na área e conseqüentemente na concentração plasmática da INH.

Alíquotas de soro utilizadas na validação do método não apresentaram picos nos tempos de retenção dos compostos (Figura 6).

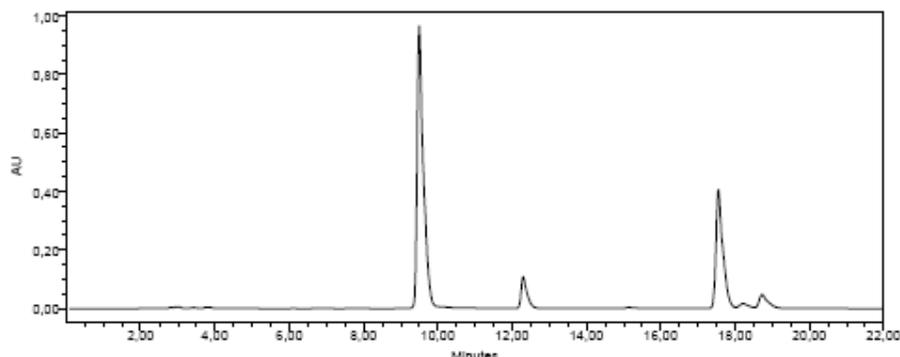


Figura 6 – Cromatograma relativo ao pool de soro sem adição de INH ou metabólitos (branco).

O pool de soro utilizado foi humano; tal procedimento de substituição ao pool de animais pôde ser realizado por não apresentar diferenças no cromatograma; além do que, para alcançar a quantidade necessária de soro para toda análise da validação precisaria de um elevado número de ratos.

As curvas de calibração em soro foram construídas no intervalo de 0,78 – 50 $\mu\text{g/mL}$ para INH (na presença e ausência de hidrólise) e AcINH, no intervalo de 50 – 400 ng/mL para Hz e de 70 – 400 ng/mL para AcHz, com coeficiente de correlação (R) de 0,99993 para INH, 0,99999 para INH com hidrólise, 0,99997 para AcINH, 0,99828 para Hz e 0,99994 para AcHz (Figuras 7Aa – 7Ab, 7B, 7C e 7D), mostrando resultados semelhantes aos estudos realizados por Seifart e colaboradores (1995), 0,99979 para INH, 0,99919 para INH com hidrólise, 0,99991 para AcINH, 0,99993 para Hz e 0,99984 para AcHz.

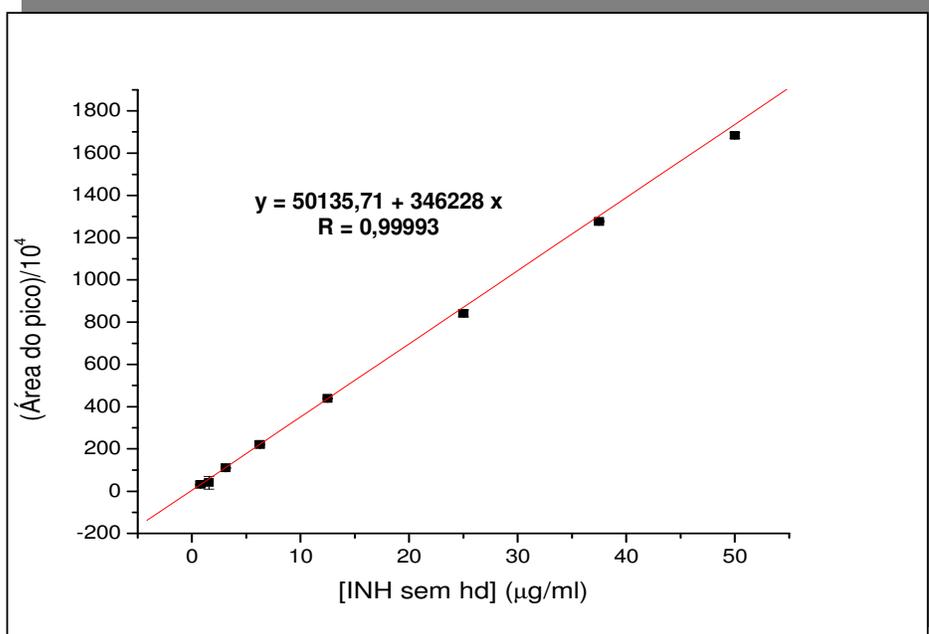
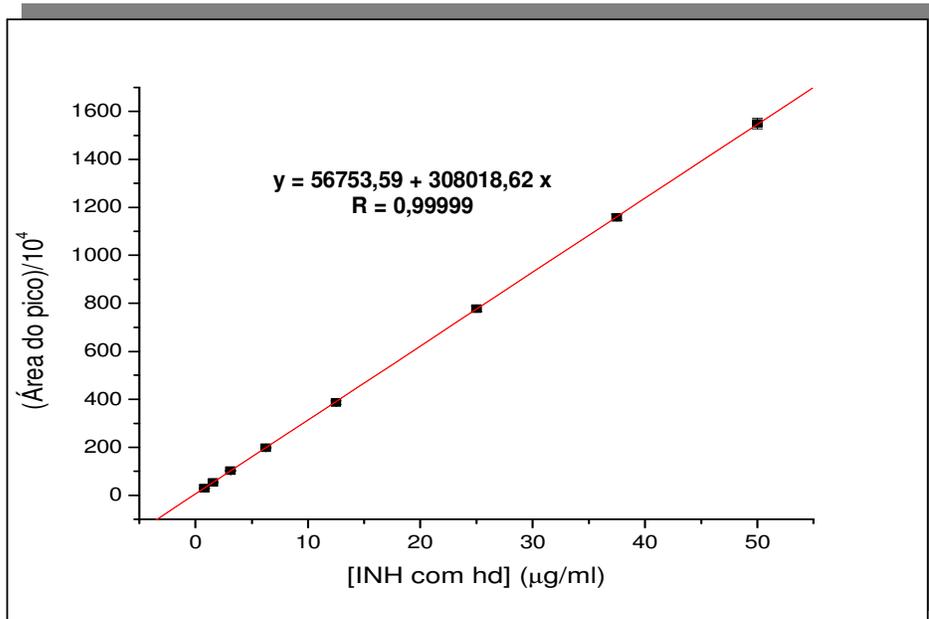
**a****b**

Figura 7A. Curvas de calibração em soro (a) INH na ausência de hidrólise; (b) INH na presença de hidrólise.

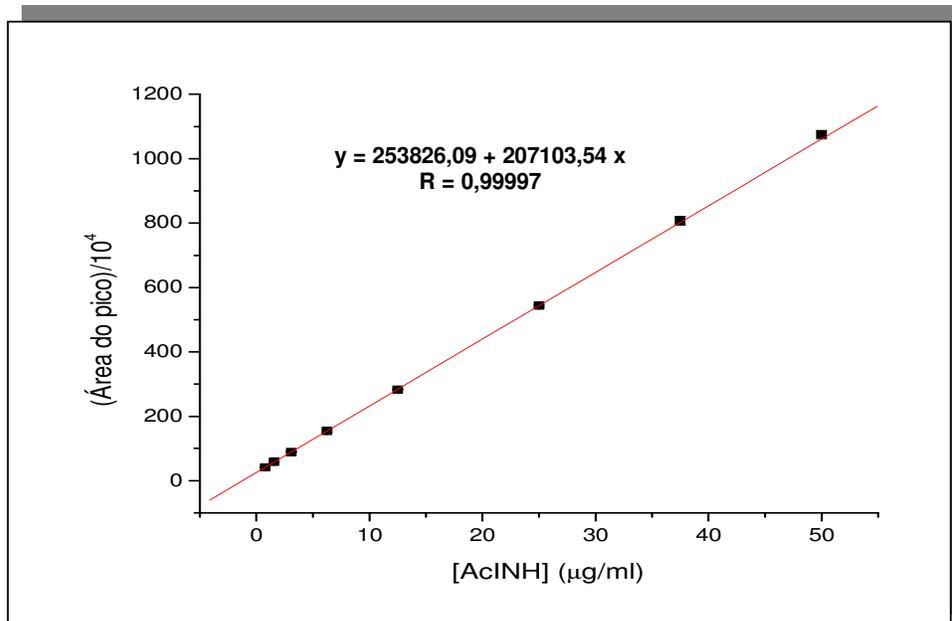


Figura 7B. Curvas de calibração em soro da AcINH.

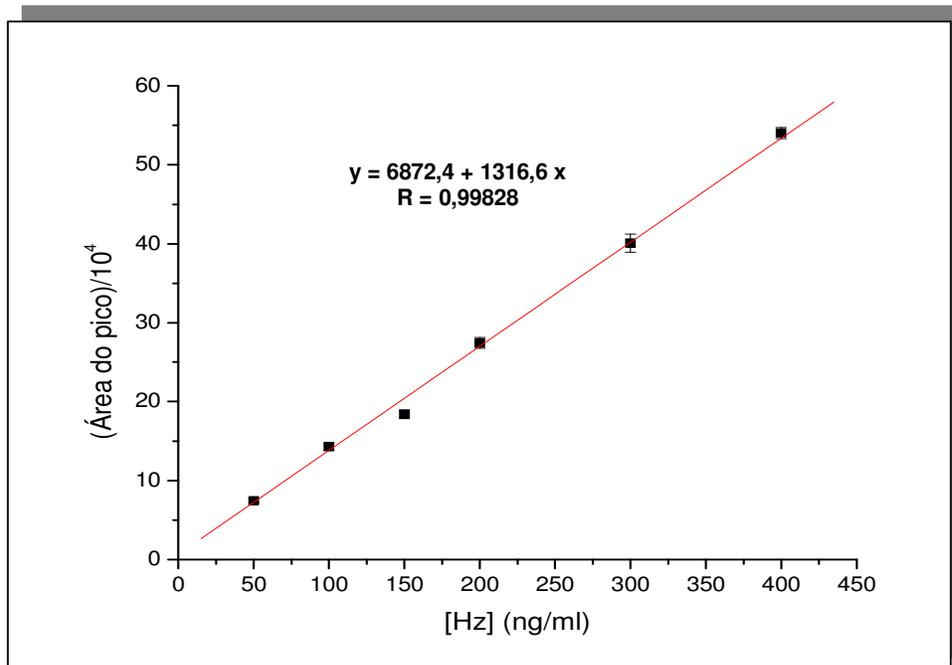


Figura 7C. Curvas de calibração em soro da Hz.

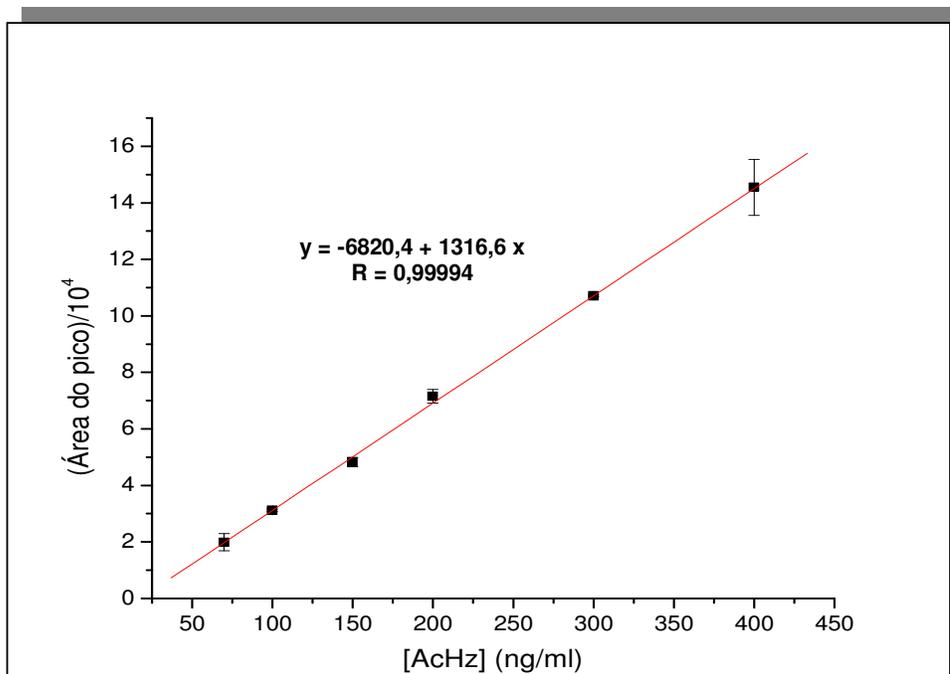


Figura 7D. Curvas de calibração em soro da AcHz.

Os limites de detecção foram definidos em 50 ng/mL para INH, 70 ng/mL para AcINH, 25 ng/mL para Hz e 36 ng/mL para AcHz (Tabela 3). Os valores alcançados em nosso estudo para INH e AcINH foram inferiores aos obtidos por Seifart e colaboradores (1995) (500 ng/mL para ambos os compostos), portanto nosso método apresentou maior sensibilidade. Já para os demais derivados (AcHz e Hz), os nossos resultados apresentam menor sensibilidade quando comparados aos resultados obtidos por Seifart e colaboradores (1995) de 10 ng/mL para Hz e AcHz.

Os limites de quantificação para a determinação da INH e metabólitos foram definidos em 70 ng/mL para INH, 100 ng/mL para AcINH, 40 ng/mL para Hz e 60 ng/mL para AcHz (Tabela 3), valores inferiores do que aqueles obtidos na análise das amostras, portanto, resultados aceitáveis para a aplicação do método no estudo da farmacocinética.

O método foi considerado linear até a concentração de 75 µg/mL para INH e AcINH e 800 ng/mL para Hz e AcHz (Tabela 3).

Tabela 3 – Limites de detecção, quantificação e linearidade dos métodos de análise dos derivados de INH e Hz em soro (n = 3).

	INH	AcINH	Hz	AcHz
Limite de detecção (ng/mL)	50	70	25	36
(CV%)	1,1	3,6	4,2	5,9
Limite de quantificação (ng/mL)	70	100	40	60
(CV%)	4,0	3,3	4,2	5,9
Linearidade (ng/mL)	780 - 75000	780 - 75000	50 - 800	70 - 800
(R)	0,99993	0,99997	0,99828	0,99994

CV= coeficiente de variação

As concentrações de INH e seus metabólitos determinadas no nosso trabalho foram superiores aos limites de quantificação obtidos durante o estudo de validação.

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 para AcINH (Tabela 4), demonstrando que tal metabólito é instável na amostra, necessitando, portanto, de análise imediata após a coleta da amostra biológica.

Tabela 4- Estabilidade da INH e metabólitos em soro em curta e média duração (n = 5).

Concentração adicionada	Curta duração (CV%)	Média duração (CV%)
INH		
1 ug/ml	4,8	13,0
10 ug/ml	8,0	7,9
40 ug/ml	3,4	5,7
AcINH		
1 ug/ml	58,6	78,1
10 ug/ml	46,0	65,8
40 ug/ml	17,4	50,3
Hz		
40 ng/ml	10,9	11,0
150 ng/ml	2,9	9,9
300 ng/ml	3,4	9,0
AcHz		
40 ng/ml	6,4	12,7
150 ng/ml	9,6	12,4
300 ng/ml	7,4	8,4

CV= coeficiente de variação

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão intra-ensaio e inter-ensaios em soro foram inferiores a 15%, conforme demonstrados na Tabela 5. Para a AcINH foi realizado apenas o estudo de precisão intra-ensaio, devido à sua instabilidade na amostra.

Tabela 5 - Precisão e exatidão dos métodos de análise da INH e metabólitos em soro.

Concentração adicionada	Intra-ensaio (n=10)		Inter-ensaio (n=5)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (% SE)	Precisão (CV%)	Exatidão (% SE)
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
AcINH				
5 ug/ml	2,7	0,3	-	-
15 ug/ml	7,3	11,0	-	-
30 ug/ml	3,8	14,8	-	-
Hz				
75 ng/ml	2,9	-5,8	6,0	-11,8
150 ng/ml	2,0	-0,2	5,0	3,8
300 ng/ml	3,2	-11,6	5,1	3,1
AcHz				
100 ng/ml	11,1	3,4	13,9	-6,2
200 ng/ml	7,5	-9,7	14,8	-13,5
300 ng/ml	4,2	-13,9	6,9	-14,6

CV= coeficiente de variação; ES= erro sistemático

4.2. Disposição cinética da INH e metabólitos

As amostras biológicas obtidas dos animais tratados com INH isolada, INH+PYR e INH+PYR+RMP foram submetidas ao procedimento analítico anteriormente descrito (item 3.4) para as determinações de INH e seus metabólitos AcINH, AcHz e Hz, a partir das quais obtivemos as curvas de concentração plasmática *versus* tempo.

As curvas de concentração plasmática *versus* tempo referentes a INH e seus metabólitos de cada grupo estão demonstradas nas Figuras 8A, 8B e 8C.

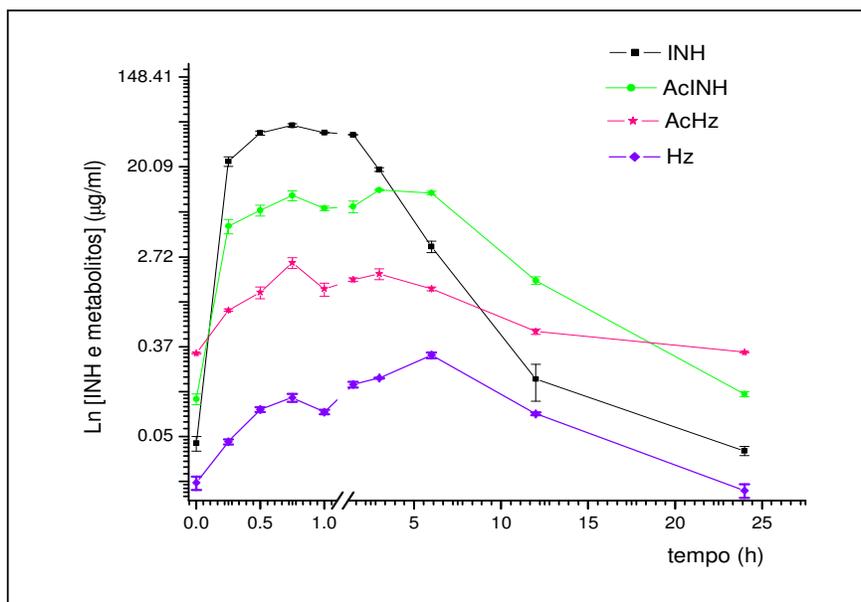


Figura 8A. Perfil da concentração plasmática versus tempo da isoniazida e metabólitos para o grupo INH isolada.

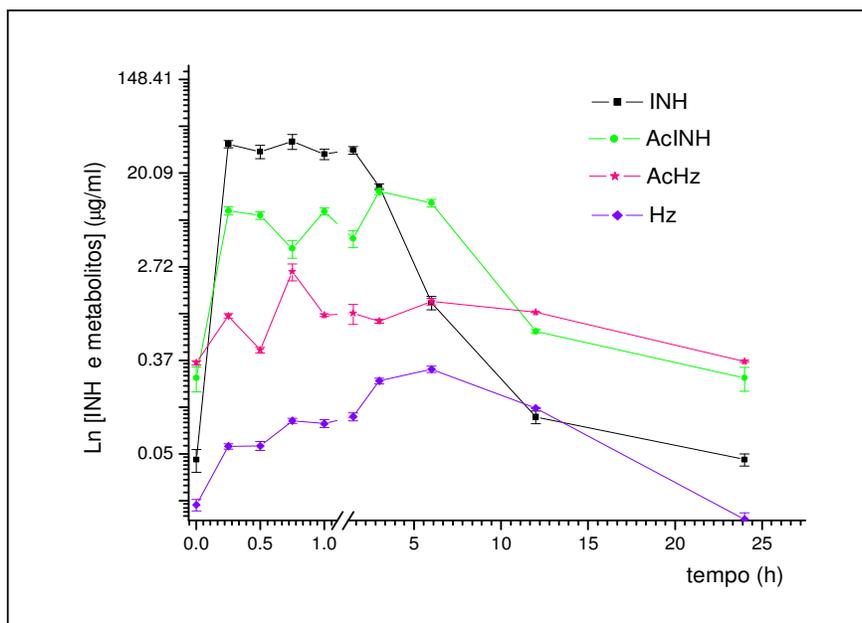


Figura 8B. Perfil da concentração plasmática versus tempo da isoniazida e metabólitos para o grupo INH + PYR.

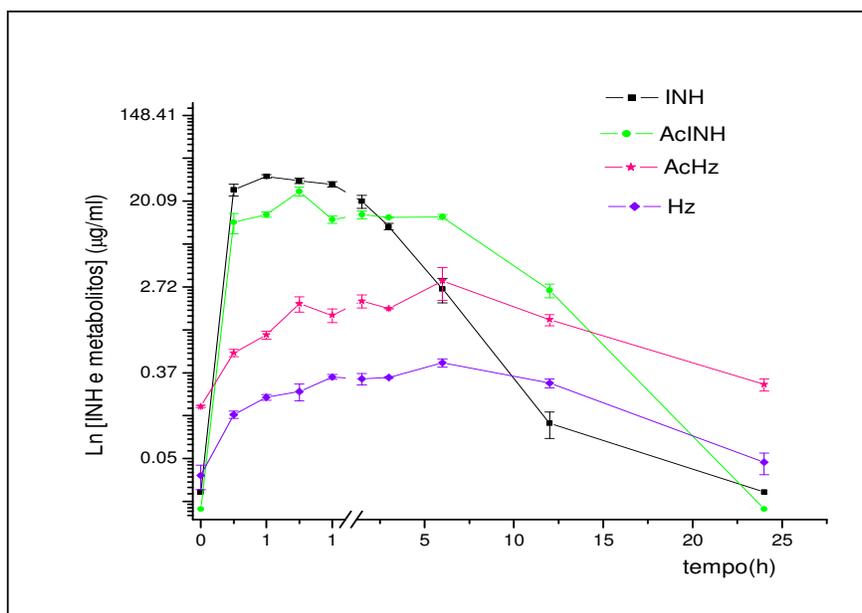
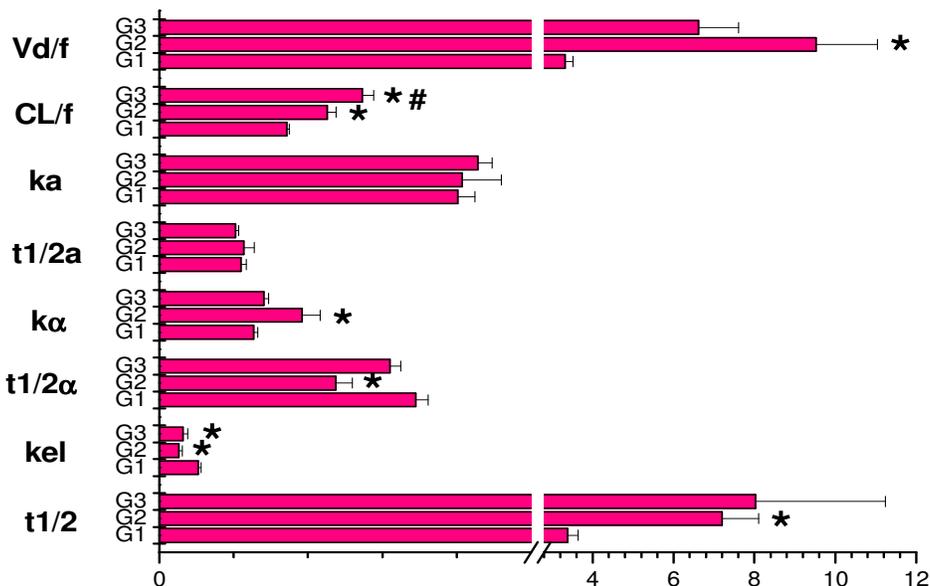


Figura 8C. Perfil da concentração plasmática versus tempo da isoniazida e metabólitos para o grupo INH + PYR + RMP

Os parâmetros farmacocinéticos da INH obtidos destes dados estão apresentados na Figura 9. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM) e foram comparados aplicando-se o teste de Tukey.

Figura 9 - Disposição cinética da **INH** nos diferentes grupos. Dados expressos como média (EPM).



Parâmetro	Grupo INH isolada	Grupo INH + PYR	Grupo INH +RMP +PYR
t ½ a (h)	0,4 (0,030)	0,5 (0,060)	0,4 (0,020)
Ka (h ⁻¹)	1,61 (0,100)	1,63 (0,210)	1,71 (0,080)
t ½ α (h)	1,4 (0,070)	1,0 (0,100) *	1,2 (0,060)
α (h ⁻¹)	0,51 (0,024)	0,77 (0,100) *	0,56 (0,025)
Vd/F (L.Kg ⁻¹)	3,32 (0,19)	9,52 (1,52) *	6,62 (0,99)
Cl _T / F (L.h ⁻¹ .Kg ⁻¹)	0,68 (0,016)	0,90 (0,047) *	1,09 (0,061) * #
t ½ β (h)	3,4 (0,026)	7,2 (0,910) *	8,02 (0,400)
β (h ⁻¹)	0,21 (0,015)	0,10 (0,018) *	0,13 (0,027) *
Cp _{ss} (µg/mL)	6,10 (0,136)	4,66 (0,233)*	3,86 (0,206)*#

G1- grupo INH; G2 – grupo INH + PYR; G3 – grupo INH + PYR + RMP.

*p< 0,05 em relação ao grupo INH; Tukey.

p< 0,05 em relação ao grupo INH + PYR; Tukey.

Na comparação do parâmetro t ½ β foi aplicado o teste de Dunn's.

$t_{1/2\alpha}$ = 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; $C_{p_{ss}}$ = concentração média no estado de equilíbrio.

Quanto à disposição cinética da INH, foi possível observar que não houve diferença estatística significativa nos valores de meia vida de absorção e constantes de absorção entre os grupos estudados.

A meia vida de distribuição obtida para o grupo INH+PYR foi significativamente menor quando comparado ao grupo da INH isolada; e o volume de distribuição significativamente maior no grupo dessa associação. Este fato poderia estar associado à competição entre os fármacos pela ligação com proteínas plasmáticas, com deslocamento da INH e ligação preferencial à PYR, com conseqüente aumento na distribuição da isoniazida. No entanto consideramos essa hipótese pouco provável uma vez que a ligação protéica da INH e da PYR é da ordem de 10 a 15%, ou seja, pequena porcentagem de ligação e, caso ocorra competição, as conseqüências seriam pouco significativas sobre os parâmetros farmacocinéticos.

O grupo que recebeu INH isolada apresentou uma meia vida de eliminação de aproximadamente 3,4h. Com a adição da PYR na terapia (grupo INH+PYR), houve um aumento estatisticamente significativo da meia vida de eliminação da INH, para 7,2h. A constante de eliminação (K_{el} ou β) para o grupo da INH isolada foi de $0,21h^{-1}$ e para o grupo da associação INH+PYR foi de $0,1h^{-1}$, diferentes estatisticamente e significativamente menor para o grupo da associação.

Jayaram et al. (2004) encontraram valores de 0,4 a 1,6h para a meia vida de eliminação da INH administrada em camundongos por gavagem nas doses de 0,1; 1; 3; 10; 30; 90 e 120 mg/kg. Os autores concluem, ainda, que nesse intervalo de dose a INH apresenta cinética linear. Grosset et al. (1992) encontraram valores de meia vida de eliminação em camundongos na ordem de $1,7 \pm 0,17$ h após administração de doses múltiplas de INH (25mg/kg).

Os valores encontrados em nosso trabalho são significativamente maiores quando comparados aos obtidos por Grosset et al. (1992). É importante ressaltar o grande aumento da meia vida no grupo da associação quando comparada ao grupo que recebeu somente INH.

Os valores de meia vida de eliminação da INH em humanos encontrados na literatura são da ordem de 1 a 4h (HARDMAN & LIMBIRD, 2004), e variam consideravelmente de acordo com o fenótipo acetilador.

O clearance da INH (Cl_T/F) observado em nosso estudo foi de aproximadamente 11,33mL/min.Kg. Belanger et al. (1989) apresenta valores entre 8,19 a 10,09 mL/min.Kg para ratos que receberam dose única de INH (20 mg/Kg). Portanto valores semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, cujos animais receberam dose 5 vezes superior. Os valores de Clearance obtidos para os três grupos foram diferentes entre si. Na associação INH+PYR foram significativamente maiores quando comparados ao grupo da INH isolada, e no grupo que recebeu a tríade, os valores foram ainda maiores.

Singhal & Varshney (1989) observaram que a administração simultânea de INH+PYR em humanos resultou em uma diminuição no C_{max} e K_{el} e aumento na meia vida e V_d da PYR. Constataram também uma diminuição na concentração sérica da PYR, indicando a possibilidade de que a administração simultânea da INH

iniba sua absorção; porém tal redução não levou a valores plasmáticos inferiores aos necessários para o efeito terapêutico no tratamento da tuberculose. Resultados semelhantes ao trabalho de Singhal & Varshney (1989) foram encontrados em nosso estudo, onde a PYR influenciou de maneira significativa no aumento da meia vida e do Vd da INH, além de aumentar seu Cl e diminuir sua AUC^{ss}_{0-24} .

Em nosso trabalho, na presença de PYR houve redução nas concentrações plasmáticas da INH; a concentração plasmática média no estado de equilíbrio ($C_{p_{ss}}$) encontrada no grupo que recebeu INH isolada foi de aproximadamente 6,10 μ g/mL, no grupo INH+PYR foi de 4,66 μ g/mL e no grupo INH+PYR+RMP foi de 3,86 μ g/mL; observamos que à medida que associamos os fármacos houve diminuição progressiva da concentração plasmática média da INH, porém tais valores não foram inferiores aos necessários para o efeito terapêutico.

Jain e colaboradores (1993) estudaram, em humanos, o efeito da PYR sobre a farmacocinética da RMP comparando um grupo sob tratamento com INH+RMP (estudo A) e outro em tratamento com INH+RMP+PYR (estudo B). No grupo que recebeu PYR foi observado menores concentrações de RMP, com menor AUC e aumento do clearance para o fármaco.

Em nosso estudo os resultados apresentados pelo grupo tríade (INH+RMP+PYR), quando comparados ao grupo INH isolada, demonstraram uma diminuição da K_{el} da INH e um aumento muito significativo do Cl.

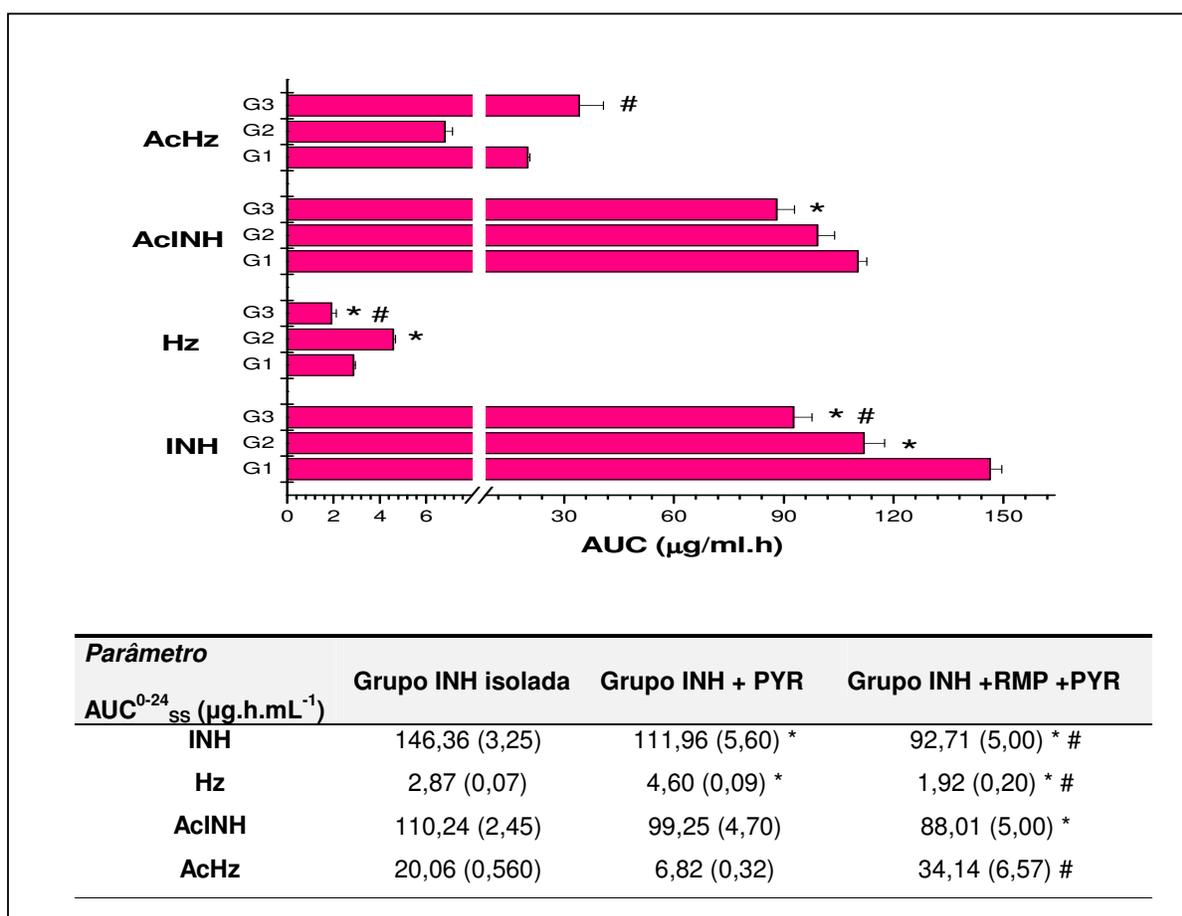
Em estudo paralelo realizado pela nossa equipe, a RMP associada à INH foi responsável pela diminuição da meia vida de eliminação da INH.

O parâmetro meia vida da INH do grupo tríade não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo INH isolada. Esse resultado sugere uma

oposição de efeitos entre a RMP e a PYR sobre a meia vida da INH, onde a RMP diminui o parâmetro e a PYR o aumenta.

As áreas sob a curva (AUCs) da INH e metabólitos estão apresentados na Figura 10. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM) e foram comparados aplicando-se o teste de Tukey.

Figura 10 – Área sob a curva da INH, Hz, AcINH e AcHz nos diferentes grupos. Dados expressos como média (EPM).



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

G1- grupo INH; G2 – grupo INH + PYR; G3 – grupo INH + PYR + RMP.

* $p < 0,05$ em relação ao G1; Tukey.

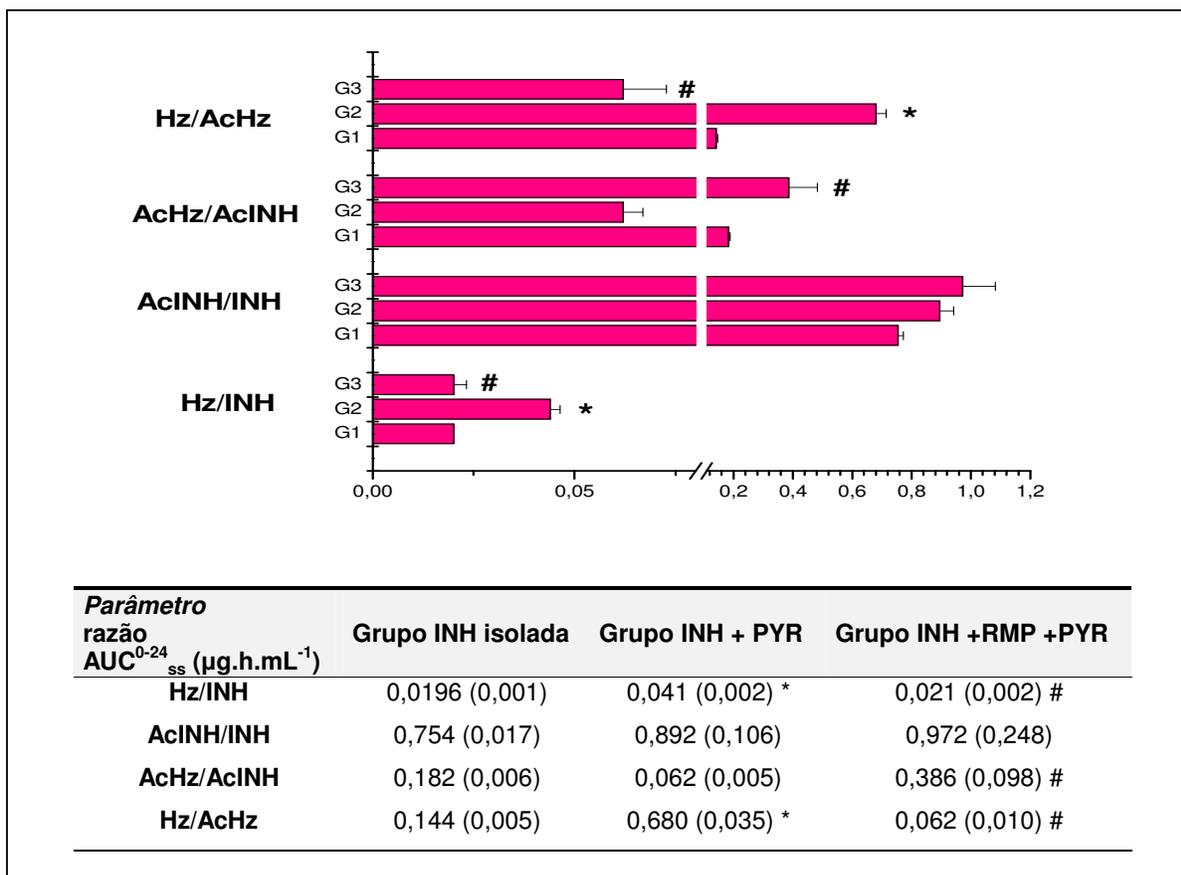
$p < 0,05$ em relação ao G2; Tukey.

A AUC^{0-24}_{ss} da INH observada no grupo que recebeu INH isolada foi de 146,36 μ g.h/mL, para o grupo da associação INH+PYR foi de 111,96 μ g.h/mL, e da associação INH+PYR+RMP foi de 92,71 μ g.h/mL; sendo os três estatisticamente diferentes entre si. Assim, observamos que na presença da PYR ocorre diminuição da AUC da INH e quando somamos a RMP ao tratamento a AUC da INH diminui ainda mais significativamente.

Grosset et al. (1992) observaram valores de $AUC_{0-\infty}$ de 52,2 μ g.h/mL para camundongos tratados com INH em doses múltiplas (25mg/Kg). No mesmo trabalho, foi observado que a administração concomitante de INH e PYR não acarretou diferença significativa na AUC da PYR e que a administração concomitante INH e RMP levou a uma diminuição da AUC da RMP em 39,4%. Os autores concluem que a INH não afeta os parâmetros farmacocinéticos da PYR, com exceção da meia vida de eliminação, que se encontra aumentada na associação.

As razões metabólito/precursor estão apresentadas na Figura 11; os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM) e foram comparados aplicando-se o teste de Tukey.

Figura 11. Razão metabólito/precursor. Dados expressos como média (EPM).



G1- grupo INH; G2 – grupo INH + PYR; G3 – grupo INH + PYR + RMP.

* $p < 0,05$ em relação ao G1; Tukey.

$p < 0,05$ em relação ao G2; Tukey.

Quanto à produção do metabólito Hz no grupo que recebeu INH+PYR a AUC_{ss}^{0-24} foi significativamente maior do que aquela observada no grupo que recebeu apenas INH ($4,6\mu\text{g.h/mL}$ versus $2,87\mu\text{g.h/mL}$, respectivamente) assim como significativamente maior quando comparada ao grupo que recebeu a tríade ($4,6\mu\text{g.h/mL}$ versus $1,92\mu\text{g.h/mL}$, respectivamente).

O acúmulo de Hz pode ser devido ao aumento da produção, diminuição da eliminação ou a ambos os processos.

Sabe-se que a Hz pode ser formada pela hidrólise da INH ou da AcHz e que o seu metabolismo envolve a oxidação por CYP2E1.

Apesar de observarmos, no grupo INH+PYR, uma diminuição da AUC da INH e uma tendência a diminuição da AUC da AcINH, não é possível afirmar se o aumento de Hz é devido ao aumento na produção ou diminuição no seu metabolismo uma vez que desconhecemos a quantidade de Hz inalterada que foi eliminada na urina.

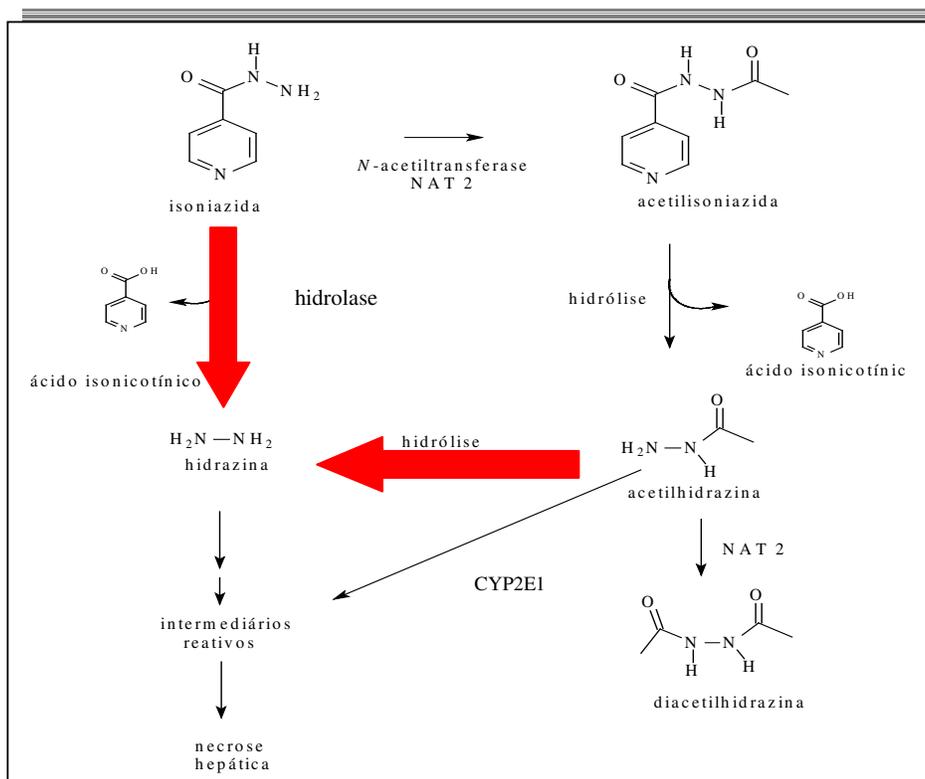
Um dos objetivos deste estudo foi verificar se a associação INH + PYR leva a modificações na taxa de formação de um ou mais metabólitos da INH quando comparada à administração da INH isolada e se essas alterações no metabolismo relacionam-se com o aparecimento de dano hepático mensurado através da atividade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

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.

Para a Hz, as duas vias observáveis em nosso estudo são a formação do metabólito a partir da INH e a partir da AcHz; dessa forma calculamos as relações $AUC^{0-24}_{ss} \text{ Hz} / AUC^{0-24}_{ss} \text{ INH}$ e $AUC^{0-24}_{ss} \text{ Hz} / AUC^{0-24}_{ss} \text{ AcHz}$.

Encontramos, para o grupo da associação INH+PYR um aumento na relação metabólito/precursor em 109% (a partir da INH) e um aumento na ordem de 372% na produção do metabólito a partir da AcHz. Assim, a produção de Hz a partir da INH por ação de enzimas microssomais e a partir da hidrólise da AcHz está significativamente aumentada no grupo da associação INH+PYR (Esquema 1).

Consideramos, no entanto, que a determinação da quantidade de Hz excretada inalterada na urina é essencial para o pleno entendimento do mecanismo pelo qual ocorre o acúmulo do metabólito, uma vez que poderíamos observar se houve ou não alteração no seu processo de decomposição. No entanto, no presente trabalho, não foi possível a coleta da urina dos animais.



Esquema 1. Vias exacerbadas para formação de Hz.

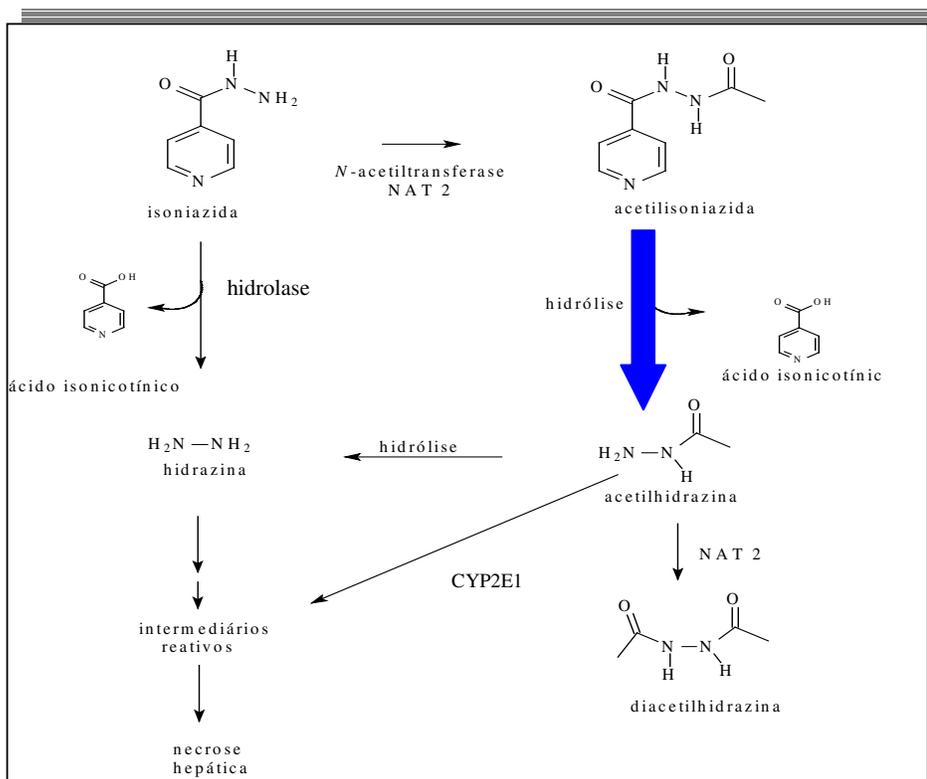
Para o metabólito AcINH, a AUC_{ss}^{0-24} encontrada para o grupos de animais que recebeu somente INH foi de 110,24 μ g.h/mL; e apenas o grupo que recebeu a tríade apresentou valor estatisticamente diferente - 88,01 μ g.h/mL - menor produção de AcINH.

Investigamos as relações AUC_{ss}^{0-24} AcINH/ AUC_{ss}^{0-24} INH no diferentes grupos estudados e não encontramos diferenças estatísticas significativas, sugerindo que

não há aumento ou diminuição da acetilação direta da INH quando há associação com PYR ou PYR+RMP.

Para o metabólito AcHz, a AUC^{0-24}_{ss} encontrada para o grupo de animais que recebeu somente INH foi de 20,06 μ g.h/mL; porém observamos diferenças significativas somente entre os grupos INH+PYR e INH+PYR+RMP, com valores de 6,83 μ g.h/mL e 34,14 μ g.h/mL, respectivamente. Assim, no grupo tríade a AUC^{0-24}_{ss} da AcHz foi maior quando comparada ao valor encontrado para a associação INH+PYR.

Investigamos as relações $AUC^{0-24}_{ss} \text{ AcHz}/AUC^{0-24}_{ss} \text{ AcINH}$ nos diferentes grupos estudados e encontramos diferenças estatísticas significativas apenas entre os grupos INH+PYR e tríade, com valores significativamente maiores no segundo grupo, sugerindo favorecimento do processo de hidrólise da AcINH quando adicionamos RMP ao tratamento (Esquema 2).



Esquema 2. Via exacerbada para formação de AcHz.

Em estudos realizados pelo nosso grupo observou-se que a RMP, quando associada à INH, foi responsável pela diminuição da produção do metabólito Hz, enquanto que a PYR associada à INH, relatada anteriormente, foi capaz de aumentar a produção da Hz. Assim, o resultado obtido no grupo tríade propõe que o efeito da RMP adicionada à INH+PYR prevaleceu sobre o efeito da PYR. Há relatos a partir de resultados obtidos por Maddrey (2005) que o dano hepático da terapia com INH parece ser mediado por produtos metabólicos tóxicos, incluindo Hz e derivados acetilados, formados durante o metabolismo e que a combinação de fármacos pode estar associada à redução na produção de metabólitos intermediários de INH.

Estudos em modelos experimentais têm mostrado que o metabolismo da AcHz leva a intermediários reativos, responsáveis pelo dano hepatocelular

(TIMBRELL et al., 1980; NELSON et al., 1976 and MITCHELL et al., 1976 apud PERETTI et al., 1987a).

A etapa mais importante para detoxificação da AcHz é promover sua acetilação a DAchz, composto de relativamente pequena toxicidade (WRIGHT and TIMBRELL, 1978 apud PERETTI et al., 1987a). No entanto, em nosso trabalho não foi possível quantificar tal metabólito.

Em animais tratados com indutores microsossomais do CYP450, como fenobarbital, o aumento da produção de AcINH e AcHz levou a um aumento de necrose hepática, quando comparado ao grupo pré-tratado com inibidores de CYP450 (TESTA & MAYER, 2003).

Segundo Timbrell (1977), a AcHz é hepatotóxica em animais e sua eliminação ocorre por três vias: a) AcHz excretada na urina como AcHz livre, como ácido α -oxoglutarico e ácido pirúvico hidrazona; b) acetilada à DAchz, a qual é excretada na urina; c) eliminada por metabolismo pelo sistema enzimático microsossomal hepático. Este caminho é conhecido por produzir intermediários reativos que são responsáveis pela hepatotoxicidade.

Estudos de metabolismo de ^{14}C -AcHz em ratos têm mostrado que o extenso dano hepático está correlacionado com a ligação covalente da ^{14}C -AcHz com as proteínas do fígado, havendo excreção de CO_2 (TIMBRELL, 1977).

Portanto, segundo este autor, a quantidade de AcHz metabolizada pelas enzimas microsossomais é o fator determinante para a hepatotoxicidade.

A AcHz formada em humanos pode ser metabolizada a um potente intermediário tóxico através das enzimas microsossomais, porém a quantidade metabolizada por este caminho é similar em ambos fenótipos e, portanto, a hepatotoxicidade também é esperada em ambos os grupos (TIMBRELL, 1977).

Mas há contradições a respeito do metabólito responsável pelo desenvolvimento da hepatotoxicidade. Sarich et al. (1998) encontram evidências de que a Hz apresenta um papel importante na hepatotoxicidade induzida por INH em animais e humanos. Em um dos seus estudos realizados em 1996, relatam que a Hz, e não INH nem AcHz, está mais envolvida no mecanismo patogênico de necrose hepática da hepatotoxicidade induzida por INH em coelhos (SARICH et al., 1996 apud YUE et al., 2004).

Segundo Noda e colaboradores (1988) (apud SARICH et al., 1998), a Hz é metabolizada por CYP450 NADPH redutase (redutase) a intermediários reativos *in vitro* e que são tóxicos às células hepáticas; a atividade da enzima redutase seria um importante fator no aumento da susceptibilidade da hepatotoxicidade induzida por INH. Contradizendo o estudo realizado em 1983, Noda e colaboradores (1988) verificam que o metabolismo da Hz se dá pelo processo de oxidação, pela atividade de CYP450.

Assim os dados disponíveis na literatura, apesar de controversos, apontam para a necessidade de uma avaliação mais criteriosa com relação à excreção inalterada dos metabólitos, com o objetivo de auxiliar a elucidação do mecanismo relacionado ao desenvolvimento da hepatotoxicidade decorrente da administração da INH.

4.3. Parâmetros bioquímicos (AST e ALT)

A morte celular decorrente da necrose leva à liberação de enzimas no citoplasma com conseqüentes elevações na atividade enzimática no plasma (SARICH et al., 1995).

Segundo Tasduq et al. (2005), a injúria hepática induzida por fármacos anti-tuberculose é consequência da estimulação de CYP2E1 que leva ao dano à membrana citoplasmática caracterizado por aumento dos biomarcadores.

Os parâmetros bioquímicos AST e ALT são exemplos de biomarcadores utilizados no auxílio no diagnóstico de danos hepáticos. Na hepatite por vírus e outras formas de doença hepática associada à necrose hepática, os níveis de AST e ALT no soro mostram-se elevados mesmo antes de os sinais e sintomas clínicos da doença, como a icterícia, aparecerem (BURTIS & ASHWOOD, 1998).

Na hepatite tóxica ou por vírus, a ALT é caracteristicamente tão alta ou até maior que a AST, e a relação ALT/AST (De Ritis), normalmente menor que 1, aproxima-se ou torna-se maior que a unidade (BURTIS & ASHWOOD, 1998).

Elevações nos níveis de aminotransferases a partir da terapia realizada com INH isolada aparecem dentro de algumas semanas após o início do tratamento e encontradas em 10 a 20% dos pacientes. Usualmente, essas elevações são moderadas e não estão associadas com sinais e sintomas sugestivos de dano hepático. Em muitos pacientes (na maioria deles), o uso continuado de INH é bem tolerado e freqüentemente os níveis de aminotransferases retornam aos níveis normais (MADDREY, 2005).

No presente trabalho, foi feita a avaliação das transaminases pré e pós tratamento com os fármacos anti-tuberculose com o objetivo de observar possíveis danos hepáticos decorrentes da exposição à INH, aos seus metabólitos e aos fármacos PYR e RMP.

Os parâmetros bioquímicos AST e ALT obtidos através da determinação pelo método colorimétrico Kit Labtest (ref.:181104) estão demonstrados na Tabela 9 e

nas Figuras 12A e 12B através das razões de suas atividades pós tratamento/ pré tratamento (EPM).

Tabela 6. Razão pós-tratamento/pré-tratamento das transaminases AST e ALT.

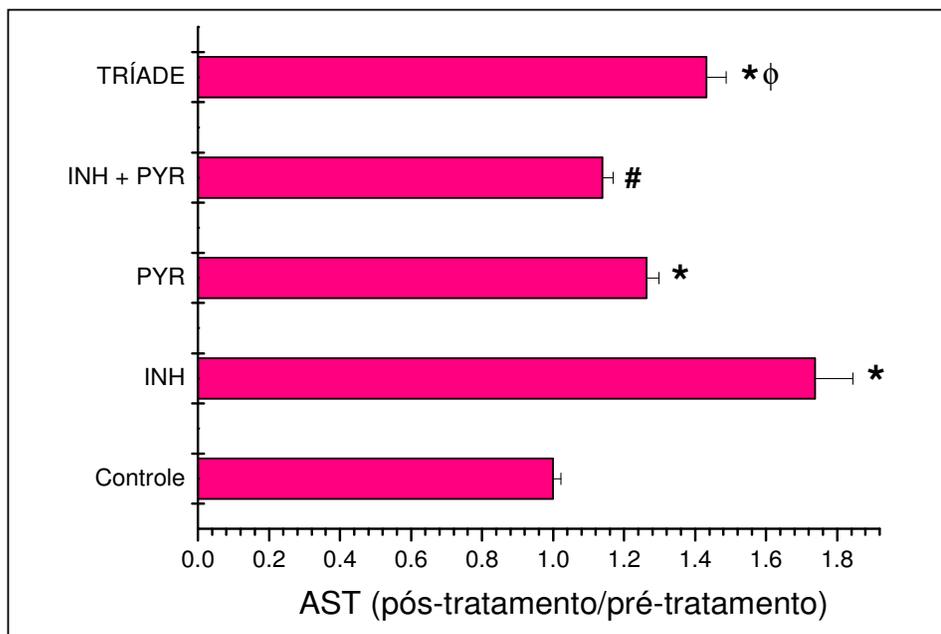
Grupos	AST pós/pré (EPM)	ALT pós/pré (EPM)
Controle	0,999 (0,023)	0,802 (0,021)
INH	1,737 (0,108)*	1,302 (0,070)*
PYR	1,264 (0,034)*	1,165 (0,028)*
INH + PYR	1,139 (0,030)#	1,163 (0,063)*
INH + RMP + PYR	1,432 (0,056)* φ	1,180 (0,046)*

*p < 0,05 em relação ao grupo controle.

p < 0,05 em relação ao INH; Dunn`s.

φ p < 0,05 em relação ao INH + PYR; Dunn`s.

Figura 12A. Razão pós-tratamento/pré-tratamento da transaminase AST.

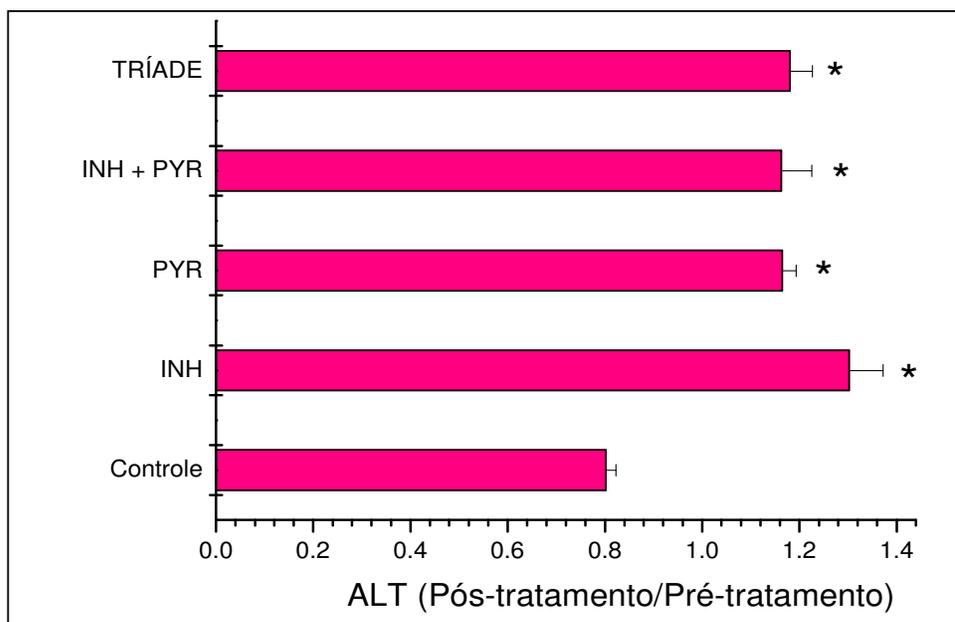


* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

$p < 0,05$ em relação ao INH; Dunn`s.

φ $p < 0,05$ em relação ao INH + PYR; Dunn`s.

Figura 12B. Razão pós-tratamento/pré-tratamento da transaminase ALT.



* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; Dunn's.

A razão pós/pré-tratamento em cada grupo foi o parâmetro escolhido para realizarmos as comparações entre os grupos.

Os resultados obtidos pela determinação da AST demonstraram que os grupos INH isolada, PYR isolada e tríade apresentaram elevações significativas na sua atividade em relação ao grupo controle, entretanto, o grupo INH+PYR não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle.

Já a ALT apresentou aumento significativo de sua atividade em todos os grupos quando comparados ao grupo controle.

Vale ressaltar que o parâmetro ALT é mais específico a danos hepáticos em relação à AST. A ALT é específica ao fígado e sua principal aplicação clínica se dá na doença hepática parenquimatosa, enquanto que a AST também é encontrada no músculo esquelético, coração, rins e hemácias e suas principais aplicações clínicas

se dão no infarto do miocárdio, doença hepática parenquimatosa e doença muscular (BURTIS & ASHWOOD, 1998).

Tasduq et al. (2005) investigaram alterações bioquímicas relacionadas à manifestação de hepatotoxicidade (ALT, AST, fosfatase alcalina – ALP e bilirrubina) em ratos tratados diariamente com a associação INH (50mg/Kg), RMP (250mg/Kg) e PYR (100mg/Kg) por 12 semanas e observaram aumento da atividade de ALT e AST em 243 e 159%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (salina). Os valores de ALP foram aumentados em 123% e bilirrubina em 129%. Esses dados sugerem que os biomarcadores de toxicidade hepática foram significativamente estimulados após a combinação dos agentes tuberculostáticos.

Nos estudos realizados por Sarich e colaboradores (1995) observou-se que não há correlação entre a concentração de INH e a susceptibilidade à hepatotoxicidade induzida por INH. Isto sustenta o papel do metabólito da INH como responsável pela produção de hepatotoxicidade. Sugere-se que o mecanismo da hepatotoxicidade induzida por INH envolva a conversão de metabólitos de INH por enzimas dependentes do CYP450 em espécies hepatotóxicas. Tais dados fornecem base à possível potencialização da hepatotoxicidade induzida por INH com indução do CYP450 por fenobarbital. O pré-tratamento com fenobarbital em coelhos anterior ao tratamento com INH resultou em um significativo aumento na atividade da ASAL (ácido arginino-succínico liase) quando comparado aos animais tratados apenas com INH.

Outros estudos revelaram que a ação hepatotóxica dos metabólitos da INH é influenciada pela RMP, a qual induz o metabolismo da INH pela hidrolase resultando na formação de ácido isonicotínico e Hz (SARMA et al., 1986 and BLAIR et al., 1985 apud SHARMA, 2004).

Em nosso estudo foi possível observar o aumento da atividade das transaminases nos grupos tratados com agentes tuberculostáticos, porém a correlação com o metabólito formado não foi possível, uma vez que obtivemos diferentes produções de metabólitos nos diferentes grupos, mas o biomarcador de hepatotoxicidade se manteve constante e elevado em todos os grupos estudados. Vale ressaltar que a exposição à PYR isoladamente também levou a um aumento significativo das transaminases tornando difícil a correlação produção de metabólitos da INH e aumento de transaminases.

O aumento na atividade de ALT observado após um período relativamente longo de administração de INH e PYR 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+75mg/kg) e RMP+PYR (75+1000mg/kg) por 4 semanas. Nesse trabalho foram também encontrados 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+75mg/kg) e RMP+PYR (75+1000g/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 26,7UI/L, respectivamente), que retornou a valores próximos ao controle após 4 semanas, e não diferentes estatisticamente (58,9 UI/L vs 35UI/L) (LENAERTS et al., 2005).

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.

Com base nesses dados, inferimos que se ocorreu perda de conteúdo celular, o aumento da atividade de ALT observado é menor do que aquele que realmente ocorreu durante a administração dos tuberculostáticos.

Vale ressaltar que no trabalho de Lenaerts et al. (2005), os estudos histopatológicos não revelaram dano hepático significativo em nenhum dos grupos.

Diversos autores sugerem que a AchZ é responsável pela indução do dano hepático (TIMBRELL et al., 1977). Em nosso estudo, a AchZ foi o metabólito que se manteve constante em relação ao grupo controle, assim como o biomarcador ALT utilizado. Este fato pode levar à hipótese de correlação entre este metabólito e dano hepático, que poderá ser confirmada em estudos de exposição a diferentes concentrações do composto. Estudos *in vitro* são mais adequados a esse propósito.

Embora autores atribuam a hepatotoxicidade aos metabólitos da INH (MADDREY, 2005; SARICH et al., 1995), há estudos que relatam que o risco de desenvolvimento de dano hepático está relacionado a outros agentes tuberculostáticos (YEE et al., 2003). No presente trabalho, a simples observação de aumento das transaminases na exposição à PYR isoladamente corrobora tal hipótese.

A RMP é raramente hepatotóxica quando administrada isoladamente, porém é um potente indutor enzimático (DURAND et al., 1996; TANEJA & KAUR, 1990; NODA et al., 1983) responsável por intensificar a ação hepatotóxica conhecida pela administração de INH (JASMER et al., 2003; DOSSING et al., 1996; TÜRKTAS et al., 1994). Já o mecanismo de hepatotoxicidade da PYR é ainda desconhecido

(SHARMA, 2004; DURAND et al., 1996), embora haja autores que discordem do efeito hepatotóxico causado por este fármaco (DURAND et al., 1995).

A PYR quando administrada isoladamente pode produzir hepatite fulminante, ou mais freqüentemente, hepatite sub-fulminante. A deficiência hepática relacionada à PYR geralmente ocorre após longos períodos de tratamento. Já a associação INH+PYR pode levar ao desenvolvimento de dano hepático por ação da INH, da PYR ou ambas (DURAND et al., 1995).

O aumento do risco de ocorrência de hepatotoxicidade severa está associado ao tratamento INH+PYR quando comparado ao tratamento com INH isolada (VAN HEST et al., 2004). Conclusões semelhantes foram descritas por Ohkawa e colaboradores (2002), os quais verificaram que a administração de PYR aumentou a probabilidade de desenvolvimento de hepatotoxicidade severa em 143 vezes quando comparada com os regimes anti-tuberculose na ausência da PYR.

Nos estudos realizados por Dossing e colaboradores (1996), a PYR e a INH apresentam hepatotoxicidade relacionada à dose, levando a manifestações clínicas de dano hepático em pequena porcentagem dos pacientes tratados com as doses atualmente recomendadas. Os resultados observados demonstraram que a PYR provocou injúria hepática em 7 pacientes, a INH em 6 e a associação INH+RMP em 1 paciente apenas.

Já a hepatotoxicidade induzida por RMP+PYR não está bem esclarecida, mas suspeita-se de que a PYR seja o problema primário. Hepatotoxicidade associada à PYR tende a ocorrer durante o segundo mês de tratamento, enquanto que a hepatotoxicidade associada à INH ocorre predominantemente no primeiro mês de terapia (KUNIMOTO et al., 2003).

A combinação RMP+PYR causou um efeito significativo nos níveis enzimáticos do fígado após extensiva exposição aos fármacos no modelo animal utilizado por Lenaerts e colaboradores (2005).

Observações semelhantes foram constatadas por Jasmer et al. (2002) e McNeill et al. (2003), cuja associação RMP+PYR está associada com maior risco de hepatotoxicidade em relação à terapia realizada apenas com INH. Portanto, o uso concomitante de RMP+PYR deve ser realizado com cautela e, que, avaliações laboratoriais freqüentes devem ser realizadas para prevenção da progressão da toxicidade severa.

Em nosso trabalho verificamos que os animais dos grupos que receberam associação medicamentosa apresentaram aumento estatisticamente significativo das transaminases em relação ao grupo controle. Porém as atividades desses biomarcadores foram semelhantes entre si, não demonstrando nenhuma ação sinérgica dos fármacos associados, como a PYR e a RMP.

Observamos que a associação INH+PYR não levou ao aumento relativo àquele observado na INH isolada dos marcadores de hepatotoxicidade apesar de levar a diferenças na formação de metabólitos e diferenças nos parâmetros farmacocinéticos da INH.

5. CONCLUSÕES

- O método analítico desenvolvido e validado apresentou sensibilidade, linearidade, seletividade, precisão e exatidão satisfatórios possibilitando sua aplicação em estudos de farmacocinética;
- A adição da PYR na terapia (INH+PYR) influenciou de maneira significativa nos parâmetros farmacocinéticos da INH, sendo responsável pela diminuição da meia vida de distribuição, constante de eliminação, AUC e concentração plasmática média no estado de equilíbrio, acarretando em uma menor disponibilidade da INH no organismo, porém foi capaz de aumentar a sua meia vida de eliminação, clearance e volume de distribuição;
- O grupo dos animais que recebeu associação INH+RMP+PYR apresentou o parâmetro clearance aumentado;
- Na associação INH+PYR, a PYR demonstrou modificar o metabolismo da INH, alterando a produção de seus metabólitos; houve um aumento significativo na concentração plasmática de Hz, sugerindo que houve ativação da via mediada por ações enzimáticas a partir da INH e da AcHz ou diminuição da decomposição desse metabólito;
- A adição da RMP no grupo tríade foi responsável pela produção de metabólitos semelhante ao grupo dos animais que recebeu INH isolada; contudo houve favorecimento na “produção” de AcHz através da hidrólise da AcINH quando comparado ao grupo INH+PYR;
- Houve aumento estatisticamente significativo na atividade dos biomarcadores AST e ALT, independente dos níveis dos metabólitos, bem como indistintamente da adição dos fármacos RMP e PYR no tratamento, demonstrando não haver ação

sinérgica destes fármacos em relação aos marcadores de hepatotoxicidade utilizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACOCELLA, G. Clinical pharmacokinetics of rifampicin. **Clin Pharmacokinet.** v. 3, p. 108-127, 1978.
2. ATHANI, A. V.; MAKOID, M. C.; BANAKAR, U. V. Issues in contemporary drug delivery. Part III. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. **J Pharm Technol.** v. 6, p. 337-503, 1990.
3. 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.
4. BAHRI, A. K.; CHIANG, C. S.; TIMBRELL, A. Acetylhydrazine hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 60, p. 561-569, 1981.
5. BELANGER, P. M.; LALANDE, M.; DORE, F. M.; LABREQUE, G. Temporal variations in the pharmacokinetics of isoniazida and N-acetylisoniazid in rats. **Drug Metab Dispos.** v. 17, n. 1, p. 91-97, 1989.
6. BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet.** v. 22, n. 1, p. 1-14, 1997.
7. BLAIR, L. A.; MANSILLA TINOCO, R.; BRODIE, M. J.; CLARE, R. A.; DOLLERY, C. T.; TIMBRELL, J. A. Plasma hydrazine concentrations in man after isoniazid and hydralazine 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. 51-72.
9. BOXENBAUM, H.G.; RIEGELMAN, S. Determination of isoniazid and metabolites in biological fluids. **J Pharm Sci**. v. 63, n. 8, p. 1191-1197, 1974.
10. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de normas para o controle da tuberculose. **J Pneumol**. v. 23, n. 6, p. 281-310, 1997.
11. BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 1091p.
12. CASTILLO, J.; LEMA, M.; CAMASELLE, L.; ALSHABEN, W.; CERVINO, L.; SALGUEIRO, M.; NOYA, M. Hepatotoxicidad por isoniacida. **Rev. Esp. Enf. Ap. Digest**. v. 60, p. 595-602, 1981.
13. CHANG, K.H. **Avaliação da bioequivalência de comprimidos contendo hidroclorotiazida**. 2002. 188f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
14. 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.
15. 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.

16. DAVIES, D.M.; FERNER, R.E.; GLANVILLE, H. **Textbook of adverse drug reactions**. 5th ed. London: Chapman & Hall Medical, 1998. p. 290-292.
17. DESTA, Z.; SOUKHOVA, N. V.; FLOCKHART, D. A. Inhibition of Cytochrome P450 (CYP450) Isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 45, n. 2, p. 382-392, 2001.
18. DOSSING, M.; WILCKE, J. T. R.; ASKGAARD, D. S.; NYBO, B. Liver injury during antituberculosis treatment: an 11-year study. **Tubercle Lung Dis**. v. 77, p. 335-340, 1996.
19. DOUGLAS, J.G.; MCLEOD, M.J. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. **Clin Pharmacokinet**. v. 37, n. 2, p. 127-146, 1999.
20. DURAND, F.; BERNUAU, J.; PESSAYRE, D.; SAMUEL, D.; BELAICHE, J.; DEGOTT, C.; BISMUTH, H.; BELGHITI, J.; ERLINGER, S.; RUEFF, B.; BENHAMOU, J. P. Deleterious influence of pyrazinamide on the outcome of patients with fulminant or subfulminant liver failure during antituberculosis treatment including isoniazid. **Hepatology**. v. 21, n. 4, p. 929-932, 1995.
21. DURAND, F.; JEBRAK, G.; PESSAYRE, D.; FOURNIER, M.; BERNUAU, J. Hepatotoxicity of antitubercular treatments. Rationale for monitoring liver status. **Drug Saf**. v. 15, n. 6, p. 394-405, 1996.
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. 211-227, 1984.

23. ELLARD, G. A.; GAMMON, P. T. Pharmacokinetics of isoniazid metabolism in man. **J Pharmacokinet Biopharm.** v. 4, p. 83-113, 1976.
24. ELLARD, G. A.; GAMMON, P. T. Pharmacokinetics of isoniazid metabolism in man. **J Pharmacokinet Biopharm.** v. 4, p. 83-113, 1976. In: LAUTERBURG, B.H.; SMITH, C.V; TODD, E.L.; MITCHELL, J.R. Pharmacokinetics of the toxic hydrazino metabolites formed from isoniazid in humans. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 235, n. 8, p. 566-570, 1985.
25. ELLENHORN, M. J.; BARCELOUX, D. G. **Medical toxicology.** New York: Elsevier, 1988. p. 367-372.
26. FACINO, R. M.; CARINI, M. The inhibitory effect of pyrazinamide on microsomal monooxygenase is related to the binding to reduced cytochrome P-450. **Pharmacol Res Commun.** v. 12, p. 523-537, 1980. In: NISHIMURA, Y.; KURATA, N.; SAKURAI, E.; YASUHARA, H. Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities. **J Pharmacol Sci.** v. 96, p. 293-300, 2004.
27. FARR, B. F. Rifamycins. In, Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th. ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, Inc., 2000, p. 2630-2636. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **GOODMAN & GILMAN:** as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2004. p. 958-959.
28. FUHR, U. Induction of drug metabolizing enzymes: pharmacokinetic and toxicology consequences in humans. **Clin Pharmacokinet.** v. 38, n. 6, p. 493-504, 2000.

29. 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: Mc Graw Hill, 2004. p. 958-959.
30. GANGADHARAM, P. R. J. Isoniazid, rifampin and hepatotoxicity. **Am Rev Respir Dis.** v. 133, p. 963-965, 1986.
31. GILLESPIE, S. H. Studies of early bactericidal activity: new insight into isoniazid pharmacokinetics. **Clin Infect Dis.** v. 39, p. 1434-1432, 2004.
32. GROSSET, J.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LACROIX, C.; JI, B. Antagonism between isoniazid and the combination pyrazinamide-rifampin 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: Mc Graw Hill, 2004. p. 955-961.
34. HOLDINESS, M. R. Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs. **Clin Pharmacokinet.** v. 9, n. 6, p. 511-544, 1984.
35. 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.
36. HUTCHINGS, D.; ROUTLEDGE, P.A. A single sample saliva test to determine acetylator phenotype. **Br J Clin Pharmacol.** v. 42, n. 5, p. 635-637, 1996.

37. HUTCHINGS, A.; MONIE, R. D.; SPRAGG, B.; ROUTLEDGE, P. A. High-performance liquid chromatographic analysis of isoniazida and acetylisoniazid in biological fluids. **J Chromatogr.** v. 277, p. 385-390, 1983.
38. JAIN, A; MEHTA, V.L.; KULSHRESTHA, S. Effect of pyrazinamide on rifampicin kinetics in patients with tuberculosis. **Tubercle Lung Dis.** v. 74, p. 87-90, 1993.
39. JASMER, R. M.; DALEY, C. L. Rifampin and pyrazinamide for treatment of latent tuberculosis infection. Is it safe. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 167, p. 809-812, 2003.
40. JASMER, R. M.; SAUKKONEM, J. J.; BLUMBERG, H. M.; DALEY, C. L.; BERNARDO, J.; VITTINGHOFF, E.; KING, M. D.; KAWAMURA, M.; HOPEWELL, P. Short-course rifampin and pyrazinamide compared with isoniazid for latent tuberculosis infection: A multicenter clinical trial. **Ann Intern Med.** v. 137, p. 640-647, 2002.
41. JAYARAM, R.; SHANDIL, K.; GAONKAR, S.; KAUR, P.; SURECH, B. L.; MAHESH, B. N.; JAYASHREE, R.; NANDI, V.; BHARATHY, S.; KANTHARAJ, E.; BALASUBRAMANIAN, V. Isoniazid pharmacokinetics-pharmacodynamics in an aerosol infection model of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 48, n. 8, p. 2951-2957, 2004.
42. JENNER, P. J.; ELLARD, G. Isoniazid – related hepatotoxicity: A study of the effect of rifampicin administration on the metabolism of acetylisoniazid in man. **Tubercle.** v. 70, n. 2, p. 93-101, 1989.
43. KARLAGANIS, G.; PERETTI, E.; LAUTERBURG, B. H. Pharmacokinetics of isoniazid and acetylhydrazine in man using stable isotopes and capillary GLC-

- ammonia. **Experientia**. v 43, p. 705, 1987. In: 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. 283-286, 1987b.
44. 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, n. 5, p. 540-551, 1998.
45. KHUHAWAR, M. Y.; RIND, F. M. A. Liquid chromatographic determination of isoniazida, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood. **J Chromatogr**. v. 766, p. 357-363, 2002.
46. KINZIG-SCHIPPERS, M.; TOMALIK-SCHART, D.; JETTER, A.; SCHEIDEL, B.; JAKOB, V.; RODAMER, M.; CASCORBI, I.; DOROSHYENKO, O.; SÖRGEL, F.; FUHR, U. Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses? **Antimicrob Agents Chemoter**. v. 49, n. 5, p. 1733-1738, 2005.
47. KOHNO, H.; KUBO, H.; YOSHINO, N.; NISHIKAWA, T. Fluorometric determination of isoniazid and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography using in-line derivatization. **Ther Drug Monit**. V. 13, p. 428-432, 1991.
48. KUNIMOTO, D.; WARMAN, A.; BECKON, A.; DOERING, D.; MELENKA, L. Severe hepatotoxicity associated with rifampicin-pyrazinamide preventive therapy

- requiring transplation in an individual at low risk for hepatotoxicity. **Clin Infect Dis.** v. 36, p. 158-161, 2003.
49. LACROIX, C.; LAINE, G.; GOULLE, J. P. Microdosage de L'isoniazide et de L'acetylisoniazide plasmatiques par chromatographie liquide à haute performance. **J Chromatogr.** v. 37, p. 137-144, 1984.
50. LAUTERBURG, B.H.; SMITH, C.V; TODD, E.L.; MITCHELL, J.R. Pharmacokinetics of the toxic hydrazino metabolites formed from isoniazid in humans. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 235, n. 8, p. 566-570, 1985.
51. LEE, W. M. Drug-induced hepatotoxicity. **N Engl J Med.** v. 349, n. 5, p. 474-485, 2003.
52. 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. 2520-2526, 2000.
53. 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.
54. LIN J. H.; LU, A. Y. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacol Rev.** v. 49, n. 4, p. 403-49, 1997.
55. MADDREY, W. C. Drug-induced hepatotoxicity. **J Clin Gastroenterol.** v. 39, n. 92, p. 83-89, 2005.

56. MCNEILL, L.; ALLEN, M.; ESTRADA, C.; COOK, P. Pyrazinamide and rifampin vs isoniazid for the treatment of latent tuberculosis. **Chest**. v. 123, p. 102-106, 2003.
57. MEIER, Y.; CAVALLARO, M.; ROOS, M.; PAULI-MAGNUS, C.; FOLKERS, G.; MEIER, P. J.; FATTINGER, K. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 61, p. 135-143, 2005.
58. MITCHELL, J. R.; ZIMMERMAN, H. J.; ISHAK, K. G.; THORGEIRSSON, U. P.; TIMBRELL, J. A.; SNODGRASS, W. R.; NELSON, S.D. Isoniazid liver injury: Clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. **Ann Intern Med**. v. 84, p. 181-192, 1976. In: PERETTI, E.; KARLAGANIS, G.; LAUTERBURG, B.H. Acetylation of acetylhydrazine, the toxic metabolite of isoniazid, in humans. Inhibition by concomitant administration of isoniazid. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 243, n. 2, p. 686-689, 1987a.
59. MITCHELL, J. R.; ZIMMERMAN, H. J.; ISHAK, K. G.; THORGEIRSSON, U. P.; TIMBRELL, J. A.; SNODGRASS, W. R.; NELSON, S.D. Isoniazid liver injury: Clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. **Ann Intern Med**. v. 84, p. 181-192, 1976. In: 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. 602-608, 1977.
60. MORI, D. M. **Estudo de marcadores enzimáticos da rotina laboratorial no diabetes experimental**. 2002. 141f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

61. MORIKE, K.; KOCH, M.; FRITZ, P.; URBAN, W.; EICHEKBAUM, M. Identification of N₂ as metabolite of acetylhydrazine in the rat. **Arch Toxicol.** V. 70, p. 300-305, 1996.
62. NELSON, S. D.; MITCHELL, J. R.; TIMBRELL, J. A.; SNODGRASS, W. R.; CORCORAN, G.B. Isoniazid and iproniazid: Activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. **Science.** v. 193, p. 901-903, 1976. In: PERETTI, E.; KARLAGANIS, G.; LAUTERBURG, B.H. Acetylation of acetylhydrazine, the toxic metabolite of isoniazid, in humans. Inhibition by concomitant administration of isoniazid. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 243, n. 2, p. 686-689, 1987a.
63. NISHIMURA, Y.; KURATA, N.; SAKURAI, E.; YASUHARA, H. Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities. **J Pharmacol Sci.** v. 96, p. 293-300, 2004.
64. NODA, A.; HSU, K.; NODA, H.; YAMAMOTO, Y.; KUROZUMI, T. Is Isoniazid hepatotoxicity induced by the metabolite, hydrazine? **J. Uoeh.** v. 5, n. 2, p. 183-190, 1983.
65. NODA, A.; NODA, H.; MISAKA, A.; SUMIMOTO, H.; TATSUMI, K. Hydrazine radical formation catalysed by rat microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 153, p. 256-260, 1988. In: SARICH, T. C.; ADAMS, S. P.; WRIGHT, J. M. The role of L-thyroxine and hepatic reductase activity in isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits. **Pharmacol Res.** v. 38, n. 3, p. 199-207, 1998.
66. OGA, S.; BASILE, A.C.; CARVALHO, M.F. **Interações medicamentosas.** São Paulo: Atheneu, 2002. p. 3-42.

67. OHKAWA, K.; HASHIGUCHI, M.; OHNO, K.; KIUCHI, C.; TAKAHASHI, S.; KONDO, S.; ECHIZEN, H.; OGATA, H. Pharmacoepidemiology and drug utilization. Risk factors for antituberculous chemotherapy-induced hepatotoxicity in Japanese pediatric patients. **Clin Pharmacol Ther.** v. 72, n. 2, p. 220-226, 2002.
68. 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.
69. PARTHASARATHY, R.; SARMA, G.R.; JANARDHANAM, B.; RAMACHANDRAN, P.; SANTHA, T.; SIVASUBRAMANIAN, S.; SOMASUNDARAM, P.R.; TRIPATHY S.P. Hepatic toxicity in south Indian patients during treatment of tuberculosis with short-course regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. **Tubercle.** v. 67, n. 2, p. 99-108, 1986.
70. 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. 2670-2679, 1997.
71. PERETTI, E.; KARLAGANIS, G.; LAUTERBURG, B.H. Acetylation of acetylhydrazine, the toxic metabolite of isoniazid, in humans. Inhibition by concomitant administration of isoniazid. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 243, n. 2, p. 686-689, 1987a.

72. 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. 283-286, 1987b.
73. RAVINDEL, P.; VAIPHEI, K.; SINGH, K.; RANA, S. V. Effect of garlic on isoniazida and rifampicin-induced hepatic injury in rats. **World Gastroenterol.** v. 12, n. 4, p. 636-639, 2006.
74. SADEG, N.; PERTAT, N.; DUTERTRE, H.; DUMONTET, M. Rapid, specific and sensitive method for isoniazid determination in serum. **J Chromatogr.** v. 675, p. 113-117, 1996.
75. SARICH, T. C.; ADAMS, S. P.; WRIGHT, J. M. The role of L-thyroxine and hepatic reductase activity in isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits. **Pharmacol Res.** v. 38, n. 3, p. 199-207, 1998.
76. SARICH, T. C.; YOUSSEFI, M.; ADAMS, S. P.; WALL, R. A.; WRIGHT, J. M. Role of hydrazine in the metabolism of isoniazid hepatotoxicity in rabbits. **Arch Toxicol.** v. 70, p. 835-840, 1996. In: YUE, J.; PENG, R.; YANG, J.; LIU, J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. **Acta Pharmacol Sin.** v. 25, n. 5, p. 699-704, 2004.
77. SARICH, T. C.; ZHOU, T.; ADAMS, S. P.; BAIN, A. I.; WALL, R. A.; WRIGHT, J. M. A model of isoniazida-induced hepatotoxicity in rabbits. **J Pharmacol Toxicol Methods.** V. 34, p. 109-116, 1995.
78. SARMA, G. R.; IMMANUEL, C.; KAILASAM, S.; NARAYANA, A. L.; VENTAKATESAN, P. Rifampicin-induced release of hydrazine from isoniazid. A

- possible cause of hepatitis during treatment of tuberculosis with regimens containing isoniazida and rifampicin. **Am Rev Respir Dis.** v. 133, p. 1072-1105, 1986. In: SHARMA, S.K. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. **Infect Genet Evol.** v. 4, p. 167-170, 2004.
79. 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. **J Chromatogr B.** v. 674, p. 269-275, 1995.
80. SELF, T. H.; CHRISMAN, C. R.; BACIEWICZ, A. M.; BRONZE, M. S. Isoniazid drug and food interactions (Review). **Am J Med Sci.** v. 317, n. 5, p. 304-311, 1999.
81. SHARMA, S. K. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. **Infect Genet Evol.** v. 4, p. 167-170, 2004.
82. 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. 1641-1643, 1996.
83. SILVA, M. **Tuberculostáticos potenciais:** Síntese de micelas poliméricas derivadas do copolímero polietileno-poliaspártico com isoniazida. São Paulo: USP, 1997. 172 f. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica) – Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

84. SINGHAL, K. C.; VARSHNEY, M. K. Effect of simultaneous isoniazid administration on pharmacokinetics parameters of pyrazinamide. **J Indian Med Assoc.** v. 89, n. 8, p. 227-229, 1989.
85. 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: Mc Graw Hill, 2004. p. 958-959.
86. SNOUDGRASS, W.; POTTER, W. Z.; TIMBRELL, J.; JOLLOW, D. J.; MITCHELL, J. R. Possible mechanism of isoniazid-related hepatic injury. **Clin Res.** v. 22, p. 323, 1974. In: 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. **J Pharmacol Toxicol Methods.** V. 34, p. 109-116, 1995.
87. 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.
88. 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.
89. TESTA, B.; MAYER, J. M. **Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. chemistry, biochemistry, and enzymology.** Zürich, Switzerland: WILEY-VCH, 2003. 148-162.
90. TIMBRELL, J. A. The role of metabolism in the hepatotoxicity of isoniazid and iproniazid. **Drug Metabol Rev.** v. 10, n. 1, p. 125-147, 1979.

91. TIMBRELL, J. A.; MITCHELL, J. R.; SNODGRASS, W.R.; NELSON, S.D. Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism *in vivo*. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 213, n. 2, p. 364-369, 1980.
92. 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. 602-608, 1977.
93. 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. 602-608, 1977. In: LAUTERBURG, B.H.; SMITH, C.V; TODD, E.L.; MITCHELL, J.R. Pharmacokinetics of the toxic hydrazino metabolites formed from isoniazid in humans. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 235, n. 8, p. 566-570, 1985.
94. TÜRKTAS, H.; ÜNSAL, M.; TÜLEK, N.; ÖRÜK, O. Hepatotoxicity of antituberculosis therapy (rifampicin, isoniazid and pyrazinamide) or viral hepatitis. **Tubercle Lung Dis.** v. 75, p. 58-60, 1994.
95. VAN HEST, R.; BAARS, H.; KIK, S.; VAN GERVEN, P.; TROMPENAARS, M. C.; KALISVAART, N.; KEIZER, S.; BORGDORF, M.; MENSEN, M.; COBELENS, F. Hepatotoxicity of rifampin-pyrazinamide and isoniazid preventive therapy and tuberculosis treatment. **Clin Infect Dis.** v. 39, p. 488-496, 2004.
96. 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.
97. WINTER, M. E. **Basic clinical pharmacokinetics.** 2nd. ed. Washington, DC: Applied Therapeutics, 1988.

98. WRIGHT, J. M.; TIMBRELL, J. A. Factors affecting the metabolism of (¹⁴C) acetylhydrazine in rats. **Drug Metab Dispos.** v. 6, p. 561-566, 1978. In: PERETTI, E.; KARLAGANIS, G.; LAUTERBURG, B.H. Acetylation of acetylhydrazine, the toxic metabolite of isoniazid, in humans. Inhibition by concomitant administration of isoniazid. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 243, n. 2, p. 686-9, 1987a.
99. YEE, D.; VALIQUETTE, C.; PELLETIER, M.; PARISIEN, I.; ROCHER, I.; MENZIES, D. Incidence of serious side effects from first line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 167, p. 1472-1477, 2003.
100. YUE, J.; PENG, R.; YANG, J.; LIU, J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. **Acta Pharmacol Sin.** v. 25, n. 5, p. 699-704, 2004.
101. ZIMMERMAN, H. F.; ISHAK, K. G. Hepatic injury due to drugs and toxins. In: MACSWEEN, R. N. M.; ANTHONY, P. P.; SCHEVER, P. J. **Pathology of the liver.** 4th. ed. London: Churchill Livingstone, 1987. Cap 16, p. 503-573.
102. ZUBER, R.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANENBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **J Cell Mol Med.** v. 6, n. 2, p. 189-198, 2002.

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](#)