

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

POLIMORFISMOS EM *CYP2E1*, *GSTM1* E *GSTT1* E
HEPATOTOXICIDADE NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE

TAÍS CESTARI DE BRITO

Porto Alegre, dezembro de 2010.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**POLIMORFISMOS EM *CYP2E1*, *GSTM1* E *GSTT1* E
HEPATOTOXICIDADE NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE**

TAÍS CESTARI DE BRITO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, dezembro de 2010.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e no Centro de Biotecnologia da UFRGS. O projeto recebeu financiamento do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) Edital 07/2006 da FEPPS, Fundação e Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“É importante aprender a não se aborrecer com opiniões diferentes das suas, mas dispor-se a trabalhar para entender como elas surgiram. Se depois de entendê-las ainda lhe parecerem falsas, então poderá combatê-las com mais eficiência do que se você tivesse se mantido simplesmente chocado.”

Bertrand Russell (1872-1970), filósofo e matemático britânico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Arnaldo Zaha, meu orientador, uma pessoa simples, com enorme arcabouço de conhecimento e otimismo para apostar em idéias novas. Muito obrigada pelo acolhimento.

À Lia, ou melhor, Dra. Lia Possuelo, minha grande mestra, que nesses seis anos de parceria, nunca hesitou em me ajudar e dividir seu conhecimento. Muito obrigada pela amizade, paciência e dedicação. Espero que nossa parceira não tenha data para acabar!

À Professora Mara Hutz, indescritivelmente indispensável! Agradeço a ela pelas mais urgentes e importantes discussões sobre os resultados do trabalho.

Às Doutoras Maria Lúcia Rossetti e Sílvia Spalding, pela oportunidade e confiança.

À Andrezza, excelente parceira para bancada, Sanatório, computador e eventos pós-laboratório. Muito obrigada pelo trabalho e amizade sempre!

À Jussara Castelan e equipe do Laboratório Exame, pela realização das provas de função hepática.

Aos funcionários do Hospital Sanatório Partenon pela colaboração.

Aos funcionários do PPGBCM, Sílvia e Luciano, sempre solícitos e simpáticos.

Aos colegas de laboratório inteligentes, experientes, e, sobretudo, interessados em compartilhar conhecimento e mão de obra. Tatiana, Patrícia, Regina, Ludmila, Martín, Ana e Paulo: muito obrigada pela ajuda, carrego grande admiração por profissionais como vocês!

Obrigada aos colegas do CDCT e dos laboratórios 206 e 210. Em meio a tantos compromissos e momentos de tensão, podemos dizer que nos divertimos!

Às colegas de laboratório, que se tornaram queridíssimas amigas, Luciana, Raquel, Fernanda, Aline e Karina. Obrigada pelo ombro, pelos conselhos e pelas risadas em grupo.

À destemida Vera, minha mãe, a grande incentivadora e financiadora do meu crescimento profissional. Não foi fácil, mas eu sei que ela faria tudo de novo!

Aos pacientes com tuberculose, que anônima e voluntariamente contribuíram para este estudo.

ÍNDICE

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 TUBERCULOSE.....	14
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3. TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	17
1.4. REAÇÕES ADVERSAS AOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE.....	18
1.5 ATUAÇÃO E METABOLISMO DOS FÁRMACOS.....	19
1.6 FARMACOGENÔMICA.....	22
1.7. ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DA ISONIAZIDA.....	23
1.7.1. <i>CYP2E1</i>	23
1.7.2. <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>	25
1.8. JUSTIFICATIVAS.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	32
3.2. PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA E SOROLOGIA.....	32
3.3. REAÇÕES ADVERSAS GASTROINTESTINAIS E DEFINIÇÃO DE HEPATOTOXICIDADE ...	33
3.4. INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM <i>CYP2E1</i>	33
3.5. INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	35
4.2. ANÁLISES DOS DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM HEPATOTOXICIDADE.....	36
4.3. GENOTIPAGEM.....	36

4.4. POLIMORFISMOS EM <i>CYP2E1</i> , <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i> E HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE.....	39
POLYMORPHISMS IN <i>CYP2E1</i> , <i>GSTM1</i> AND <i>GSTT1</i> AND ANTI-TUBERCULOSIS DRUG-INDUCED HEPATOTOXICITY	40
5. DISCUSSÃO FINAL	57
5.1. AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	57
5.2. POLIMORFISMOS EM <i>CYP2E1</i> , <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>	60
5.3. POLIMORFISMOS E HEPATOTOXICIDADE.....	65
5.4. FARMACOGENÔMICA E DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	66
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8. APÊNDICES.....	79
8.1 APÊNDICE 1:QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	80
8.2 APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	85
9. CURRICULUM VITAE RESUMIDO	88

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina-transaminase
AST	Aspartato-transaminase
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CYP	Citocromo P450
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTS	Estratégia de tratamento diretamente observado
EMB	Etambutol
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GST	Glutathione-S-transferase
HAART	Tratamento antiretroviral
HBV	Hepatite B
HCV	Hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
INH	Isoniazida
NAT2	N-acetiltransferase 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PFH	Provas de função hepática

PZA	Pirazinamida
RAM	Reação adversa a medicamento
RHZ	Esquema terapêutico: rifampicina +isoniazida + pirazinamida
RHZE	Esquema terapêutico: rifampicina +isoniazida + pirazinamida + etambutol
RMP	Rifampicina
SES/RS	Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul
SHM	Esquema terapêutico: estreptomicina + isoniazida + etambutol
SINAN	Sistema Nacional de Agravos Notificados
SM	Estreptomicina
SNP	Polimorfismo de base única
TB	Tuberculose
ULN	Limite superior normal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxas de incidência, prevalência e mortalidade para tuberculose no ano de 2008.....	16
Tabela 2: Frequência de hepatotoxicidade em diferentes populações.....	19
Tabela 3: Desfecho do tratamento para o total de pacientes.....	35
Tabela 4: Tabela comparativa dos polimorfismos na região a 5' do promotor <i>CYP2E1</i>	61
Tabela 5: Tabela comparativa dos polimorfismos no íntron 6 de <i>CYP2E1</i>	62
Tabela 6: Tabela comparativa dos polimorfismos em <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	65

LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO

Table 1: Description of primers sequence, PCR conditions, polymorphisms and restriction enzymes.....	45
Table 2: Description of all antituberculosis drug-induced hepatotoxicity cases.....	47
Table 3: Univariate analysis of clinical risk factors for hepatotoxicity development.....	48
Table 4: Pairwise LD values between SNPs in <i>CYP2E1</i> . Upward triangle is <i>p</i> -value and downward triangle is pairwise (<i>D'</i>).....	49
Table 5: Genotype characterization of the <i>CYP2E1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> and acetylation profile of NAT2 in tuberculosis patients with and without hepatotoxicity.....	50

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Rota metabólica sugerida para INH.....21

Materiais e Métodos

Figura 2: Fluxograma da logística operacional, coleta e análise de dados do estudo.....30

Figura 3: Fluxograma dos métodos realizados até a obtenção do genótipo e análise dos resultados.....31

Figura 4: Esquema ilustrativo indicando os sítios polimórficos do gene *CYP2E1* com as respectivas enzimas de restrição.....34

Resultados

Figura 5: Perfis de RFLP da região -1053 *CYP2E1* após clivagem com *RsaI*.....36

Figura 6: Perfis de RFLP da região *CYP2E1* -1293 após clivagem com *PstI*.....37

Figura 7: Perfis de RFLP da posição 7632 em *CYP2E1* após clivagem com *DraI*.....37

Figura 8: Perfis dos genótipos de *GSTM1*.....38

Figura 9: Perfis dos genótipos de *GSTT1*38

RESUMO

Um grande número de pacientes em tratamento para tuberculose desenvolve algum tipo de reação adversa. A mais grave destas, hepatotoxicidade, é, muitas vezes, atribuída aos metabólitos tóxicos gerados durante a metabolização da isoniazida (INH), principal fármaco do tratamento. A INH é metabolizada pelas enzimas *N*-acetiltransferase 2 (NAT2), citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e glutathione *S*-transferase (GSTM1 e GSTT1). Polimorfismos nos genes que codificam estas enzimas parecem influenciar na sua atividade e toxicidade, além de estarem distribuídos de forma variável entre as populações. Este estudo foi elaborado com o objetivo de estimar a frequência dos polimorfismos nos genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1*, e avaliar a relação destes genes e de fatores de risco com o desenvolvimento de hepatotoxicidade.

Foram incluídos no estudo 245 pacientes que fizeram tratamento para tuberculose no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon (Porto Alegre, RS) com rifampicina, isoniazida e pirazinamida (esquema RHZ). Esses pacientes forneceram termo de consentimento livre e esclarecido, entrevista para coleta de dados clínicos e epidemiológicos e amostra de sangue para exames de provas de função hepática e perfil genético. A identificação dos genótipos foi realizada através das técnicas de PCR para os genes *GSTM1* e *GSTT1* (presença ou ausência) e PCR-RFLP para *CYP2E1* (SNPs nas posições -1053C>T, -1293G>C e 7632T>A). Através da montagem de um banco de dados com as informações epidemiológicas e genéticas foram testadas possíveis relações entre as características.

As frequências dos alelos variantes no gene *CYP2E1* foram 8% (-1053), 8,5% (-1293) e 12% (7632). Os genes *GSTM1* e *GSTT1* estavam ausentes em 42,9% e 12,4% da população, respectivamente. Quinze (6,1%) pacientes desenvolveram hepatotoxicidade. Pacientes com genótipo selvagem em *CYP2E1*, sendo acetiladores lentos para NAT2, estão sob maior risco de desenvolver hepatotoxicidade. O genótipo nulo para *GSTM1* e *GSTT1* não teve influência na resposta ao tratamento para essa população. Os fatores de risco associados à hepatite induzida por tuberculostáticos foram: HIV positivo, tuberculose extrapulmonar e níveis elevados de transaminases basais.

ABSTRACT

Patients under treatment for tuberculosis (TB) frequently suffer adverse drug reactions. The most severe, hepatotoxicity is often related to toxic metabolites produced during the main drug metabolism, isoniazid (INH). INH is metabolized by *N*-acetyltransferase 2 (NAT2), cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and glutathione *S*-transferase (GSTM1 and GSTT1) enzymes. Polymorphisms in coding genes can modulate enzyme activity and toxicity, and are distributed in a variable way among populations. This study was designed to determine the frequency of *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* polymorphisms, and to evaluate whether clinical risk factors and polymorphism are related to drug-induced hepatotoxicity.

A total of 245 TB outpatients from Hospital Sanatorio Partenon (Porto Alegre, RS) using INH, RMP and PZA were included in the study. Patients provided a written informed consent, clinical records through an interview and blood sample for liver enzymes tests and genotyping. Individuals were genotyped using polymerase chain reaction (*GSTM1* and *GSTT1*) and restriction fragment length polymorphism (*CYP2E1*) methods. Using a database containing genetic and clinical information, possible relations were tested.

The frequencies for the *CYP2E1* polymorphic alleles *RsaI*, *PstI* and *DraI* are 8%, 8,5% and 12%, respectively. *GSTM1* and *GSTT1* genes are deleted in 42.9% and 12.4% of the population. Fifteen patients (6.1%) developed hepatotoxicity. Patients without polymorphisms in *CYP2E1*, having NAT2 slow acetylator profile, are at higher risk for drug-induced hepatotoxicity. *Null* genotype for *GSTM1* and *GSTT1* showed no influence in drug response. HIV, extrapulmonary TB and high baseline levels of transaminases are independent risk factors for hepatotoxicity in this population.

1. INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é um mal que vem assolando a humanidade desde a pré-história. Em meio a grandes epidemias e recessos, é provável que o *Mycobacterium tuberculosis* tenha provocado a morte de mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiológico (DANIEL, 2006). Em 24 de março de 1882 o médico alemão Robert Koch anunciou a descoberta do bacilo da tuberculose. A espécie *Mycobacterium tuberculosis* pertence ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales, classe Actinobacteria, filo Actinobacteria, reino Monera.

A transmissão do bacilo entre pessoas se dá através da tosse ou espirro de um indivíduo doente com a forma pulmonar bacilífera, e a consequente inalação de partículas suspensas no ar pelo outro indivíduo. O pulmão é a porta de entrada para o bacilo, causando um foco de infecção no local onde se deposita após ser inalado. Se a infecção não for contida em nível local, a disseminação do bacilo ocorre através de uma rota hematogênica, provavelmente dentro de fagócitos, atingindo a pleura e diferentes órgãos. Alcança os linfonodos hilares por via linfática, podendo ocasionar uma segunda disseminação sistêmica, através do ducto torácico e da veia cava superior, com o desenvolvimento de focos nos pulmões. Focos extrapulmonares também podem ser produzidos por disseminação hematogênica e linfática. As manifestações clínicas da TB dependem das defesas orgânicas dos sítios de multiplicação do bacilo. Acredita-se que a aplicação da vacina *bacille Calmette-Guérin* (BCG) tenha essencial importância nessa fase, evitando a disseminação e a ocorrência de formas extrapulmonares da tuberculose (PALOMINO *et al.*, 2007). Um grande número de evidências epidemiológicas sustenta que 90% dos indivíduos com infecção por tuberculose latente nunca manifestarão clinicamente a doença (SCHLUGER, 2005).

Para o tratamento da tuberculose no Brasil, utilizou-se por mais de trinta anos o chamado esquema de primeira linha, uma combinação dos fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida (RHZ) (MACIEL *et al.*, 2010). O tratamento tem duração de seis meses, com a administração das três drogas nos dois primeiros meses, seguido do uso da rifampicina (RMP) e isoniazida (INH) nos últimos quatro meses. Em 2009, o Programa

Nacional de Controle da Tuberculose, do Ministério da Saúde, passou a recomendar a adição do fármaco etambutol (EMB) ao esquema terapêutico (CONDE *et al.*, 2009). Sob condições ideais, esse regime é efetivo para 90-100% dos pacientes, e a taxa de reincidência após o tratamento é inferior a 3% (MITNICK *et al.*, 2009). Nas décadas de 1970 e 1980, presenciou-se uma euforia inicial pelas altas taxas de cura graças ao uso da INH e RMP. Em função disso, acreditou-se que a tuberculose estivesse sob controle, diminuindo o interesse por parte de estudiosos e da sociedade civil. Em paralelo, observou-se no mundo todo, uma diminuição do comprometimento político dos governantes e da qualidade das ações de controle da tuberculose (KRITSKI *et al.*, 2007). Não muito tempo depois, viu-se um crescente aumento da incidência da tuberculose no mundo, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1993, a declarar a doença em estado de emergência mundial (HIJJAR *et al.*, 2007). A principal estratégia recomendada pela OMS para mudar essa realidade foi a implementação do Tratamento Diretamente Observado (DOTS) (KRITSKI *et al.*, 2007). O Brasil se posicionou para combater o problema através da criação do Plano Emergencial para Controle da Tuberculose, lançado em 1994 pelo Ministério da Saúde. As metas eram diagnosticar, no mínimo, 90% dos casos esperados e tratar, com sucesso, pelo menos 85% deles (Hijjar 2007, manual técnico 2002). O ressurgimento da tuberculose tem sido atribuído a vários fatores, entre eles o surgimento de cepas resistentes aos fármacos usados no tratamento, a pandemia HIV/AIDS (no início dos anos 80), mudanças nas estruturas sociais, o aumento de imigrantes de países com alta prevalência para as nações desenvolvidas, o envelhecimento da população mundial, a transmissão ativa em locais de superlotação humana (prisões, hospitais, abrigos) e o desmantelamento dos sistemas de saúde pública (DUCATI *et al.*, 2006).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

- *Uma pessoa no mundo é infectada pelo bacilo da TB a cada segundo.*
- *Um terço da população mundial está infectada com o bacilo da TB.*
- *5-10% das pessoas infectadas pelo bacilo da TB (que não tem infecção pelo HIV) tornam-se doentes ou contagiantes em algum momento de suas vidas. Pessoas com co-infecção TB e HIV têm muito mais chances de desenvolver tuberculose.*

World Health Organization (WHO)

Fact sheet N°104

Março 2010

A OMS estimou que 1,3 milhões de pessoas morreram em 2008 em consequência da tuberculose. O maior número de mortes ocorreu no Sudeste Asiático, enquanto a maior mortalidade foi vista na África (Tabela 1) (WHO, 2010).

Tabela 1: Taxas de incidência, prevalência e mortalidade para tuberculose no ano de 2008 (OMS, 2010).

Região OMS	Incidência ¹			Prevalência ²		Mortalidade	
	N° em mil	% do total global	Taxa por 100 mil	N° em mil	Taxa por 100 mil	N° em mil	Taxa por 100 mil
África	2828	30%	351	3809	473	385	48
Américas	282	3%	31	221	24	29	3
Mediterrâneo Oriental	675	7%	115	929	159	115	20
Europa	425	5%	48	322	36	55	6
Sudeste Ásia	3213	34%	183	3805	216	477	27
Pacífico Ocidental	1946	21%	109	2007	112	261	15
Global	9369	100%	139	11093	164	1322	20

¹Incidência: casos novos em um período definido.

²Prevalência: número de casos (novos e antigos) existentes em um dado momento.

Uma ação combinada para garantir acesso universal ao diagnóstico e tratamento de alta qualidade da tuberculose está sendo perseguido pela maioria dos países, ao encontro da *Stop TB Strategy* (ampliação e aperfeiçoamento da estratégia DOTS; manuseio da associação TB/HIV, TBMR e outros desafios; fortalecimento dos sistemas de saúde; engajamento de provedores de assistência global; apoio dos portadores de tuberculose e das comunidades; e promoção de pesquisas), proposta pela OMS e da *TB Partnership's Global Plan to Stop TB*. Em um prazo médio, seguindo o contexto do Objetivos do Milênio (Millennium Development Goals), busca-se a redução de 50% da taxa de incidência e mortalidade até 2015, igualando-se indicadores de 1990. Um objetivo para mais longo prazo é eliminar a doença como um problema de saúde pública até 2050, reduzindo sua incidência a menos de um caso por milhão de habitantes (LÖNNROTH *et al.*, 2010).

Um grupo de 22 países concentra mais de 80% dos casos de tuberculose no mundo. O Brasil faz parte desse grupo, passando da 18^a para a 19^a posição em 2010 (SVS, 2009;SAÚDE, 2010).

Em 2008 o Brasil registrou 70.989 novos casos de tuberculose, correspondendo a uma taxa de incidência de 37,4/100.000 habitantes e de mortalidade de 2,5/100.000 habitantes. No Rio Grande do Sul, em 2008 foram notificados 4617 novos casos, sendo a taxa de incidência de 42,5/100.000 e de mortalidade de 2,68/100.000 habitantes (SINAN).

1.3. TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

No Brasil, o tratamento para tuberculose é distribuído, exclusivamente, na rede pública de saúde. O sistema de tratamento recomendado pelo Programa Nacional para o Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde desde 1979, o RHZ era utilizado para todas as formas de tuberculose sem uso prévio de medicação, e para casos de recidiva quando passados cinco anos da cura. Em 2009, algumas mudanças foram propostas:

- Introdução do quarto fármaco, o EMB, no início do tratamento (fase de ataque).
- Utilizar comprimidos, em substituição às cápsulas, com doses fixas combinadas 4 em 1 (RHZE), para a fase de tratamento intensivo, e 2 em 1 (RH), para a fase de continuação.

- Adequar as doses de INH e PZA em adultos para 300 mg/dia e 1600 mg/dia, respectivamente.

O novo esquema básico (2RHZE/4RH) é indicado para todos os casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), bem como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono. Para os casos de coinfeção TB\HIV-AIDS que necessitem de terapia antiretroviral incompatível com o uso de RMP (inibidor de proteases), a rifabutina está disponível para a composição do esquema básico, no lugar da RMP (CONDE *et al.*, 2009).

1.4. REAÇÕES ADVERSAS AOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE

A OMS define reação adversa a medicamentos (RAM) como "*resposta a um medicamento que é nociva, não intencional e que ocorre em doses normalmente usadas no homem para profilaxia, diagnóstico, terapêutica ou para modificação de função fisiológica*" (RISSATO *et al.*, 2008).

As RAMs têm recebido atenção como um forte problema de saúde pública uma vez que afetam um grande número de pessoas e representam uma parcela importante das admissões hospitalares (BRVAR *et al.*, 2009; ROUGHEAD & SEMPLE, 2009). Estudos indicam que entre 2% e 3% das admissões têm relação com medicamentos (ROUGHEAD & SEMPLE, 2009). Um estudo feito na Suécia colocou as RAMs como 7^a causa mais comum de morte (WESTER *et al.*, 2008). Um amplo estudo feito em hospitais no Reino Unido analisou 19.000 admissões e apontou que 6,5% delas estavam relacionadas à RAMs (PIRMOHAMED *et al.*, 2004). Os efeitos adversos reduzem a efetividade do tratamento para tuberculose, pois contribuem para a não adesão e conseqüente falência do tratamento, recidiva ou resistência aos fármacos (TOSTMANN *et al.*, 2008). Os principais efeitos adversos observados durante o tratamento para tuberculose com o esquema RHZ são intolerância gástrica, manifestações cutâneas variadas, icterícia e dores articulares (CASTELO FILHO *et al.*, 2004).

O dano hepático é, provavelmente, a mais séria das reações adversas observadas nos pacientes em tratamento para tuberculose. O fígado possui um papel central no

metabolismo e detoxificação dos fármacos, e está, conseqüentemente, mais exposto a toxinas derivadas dos xenobióticos (SAUKKONEN *et al.*, 2006). A hepatotoxicidade geralmente é imprevisível e ocorre em um pequeno número de pacientes mesmo quando administradas nas doses recomendadas (ROY *et al.*, 2008). A incidência de dano hepático induzido por fármacos antituberculose varia entre 1 e 47%, dependendo do regime utilizado e da definição de dano hepático e hepatotoxicidade nos diferentes estudos (HUANG, 2007). A literatura internacional registra incidências variadas de hepatotoxicidade para populações em uso do esquema RHZ ou semelhantes (tabela 2). Na publicação do II Consenso Brasileiro de Tuberculose a hepatotoxicidade induzida por fármacos é definida como a ocorrência de aumento das enzimas hepáticas acima de três vezes o valor de referência (CASTELO FILHO *et al.*, 2004).

Tabela 2: Frequência de hepatotoxicidade em diferentes populações.

População	Número de pacientes	Esquema terapêutico	Incidência de hepatotoxicidade	Critério de hepatotoxicidade	Referência
Tanzânia	112	RHZE	0,9%	ALT>3X ULN +sintomas ou	Tostmann <i>et al.</i> , 2010
Coréia	132	RHZE	13,6%	ALT > 2X ULN	Cho <i>et al.</i> , 2007
Espanha	471	RHZ	11,9%	AST/ALT > 3 x ULN ou	Fernández-Villar <i>et al.</i> ,
China	318	RHZE	15,4%	ALT > 2X ULN	Huang et al, 2003

RHZE: rifampicina + isoniazida + pirazinamida + etambutol; SHRZ: estreptomicina + isoniazida + rifampicina + pirazinamida; RHZ: rifampicina + isoniazida + pirazinamida

1.5 ATUAÇÃO E METABOLISMO DOS FÁRMACOS

O metabolismo geralmente converte fármacos a metabólitos que são mais solúveis em água e assim, mais fáceis de serem excretados. Também pode converter pró-drogas em

compostos de ação terapêutica, podendo resultar na formação de metabólitos tóxicos. A farmacologia classifica as rotas de metabolização de fármacos em reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) ou fase II, reações de conjugação (acetilação, glucuronidação, sulfonação e metilação) (WEINSHILBOUM, 2003).

A INH tem sido usada desde 1952 como o principal antimicrobiano para tuberculose. É aceito que a INH produz metabolitos reativos causando dano celular no fígado humano (WEISINGER, 2007). A INH é considerada uma pró-droga, ativada pela catalase-peroxidase, codificada pelo gene *KatG*, da micobactéria. O produto da bioativação forma um aduto covalente com NADH, inibindo a InhA, proteína enoil-acil redutase envolvida na síntese dos ácidos micólicos presentes na parede bacilar (PARK *et al.*, 2003). A INH é rápida e quase completamente absorvida pelo trato gastrointestinal. O pico das concentrações plasmáticas ocorre de uma a duas horas após a ingestão. A INH é distribuída por todo o organismo, tecidos e fluidos (pleural, ascítico, saliva, cérebro espinhal) em níveis similares aos níveis séricos. A meia-vida é de 1 a 4 horas em pacientes com funções hepática e renal normais, variando de acordo com o metabolismo individual. Em pacientes acetiladores rápidos a INH apresenta meia-vida de 0,5 a 1,6 horas e em acetiladores lentos, de 2 a 5 horas. A excreção através da urina, em adultos com função renal normal, é de aproximadamente 50-70% da dose de 5 mg/Kg dentro de 24h na forma inalterada da droga e na forma de metabólitos. A porcentagem de diferentes compostos excretados varia de acordo com o fenótipo acetilador (WEISINGER, 2007).

A principal rota do metabolismo da INH é a acetilação via N-acetil transferase 2 (NAT2), produzindo acetilisoniazida (não tóxico). Esta é então hidrolisada a acetilhidrazina (tóxico) e novamente acetilada via NAT2 formando diacetilhidrazina (menos tóxico). A taxa de acetilação é determinada por fatores genéticos. Uma segunda rota é a hidrólise da INH formando hidrazina e ácido isonicotínico. Aqui a hidrazina também sofre acetilação por NAT2 formando acetilhidrazina. Já o ácido isonicotínico é conjugado com glicina e então excretado. A acetilhidrazina formada nas duas rotas pode ser oxidada via citocromo P450 2E1 (CYP2E1) formando metabólitos reativos (Figura 1) (ROY *et al.*, 2008). A INH e RMP parecem ter um efeito sinérgico ou aditivo, contribuindo para a hepatotoxicidade. Um possível mecanismo é o agravamento da toxicidade hepática causada pela acetilhidrazina, hidrazina e compostos resultantes da ação enzimática no metabolismo hepático (YEW & LEUNG, 2006).

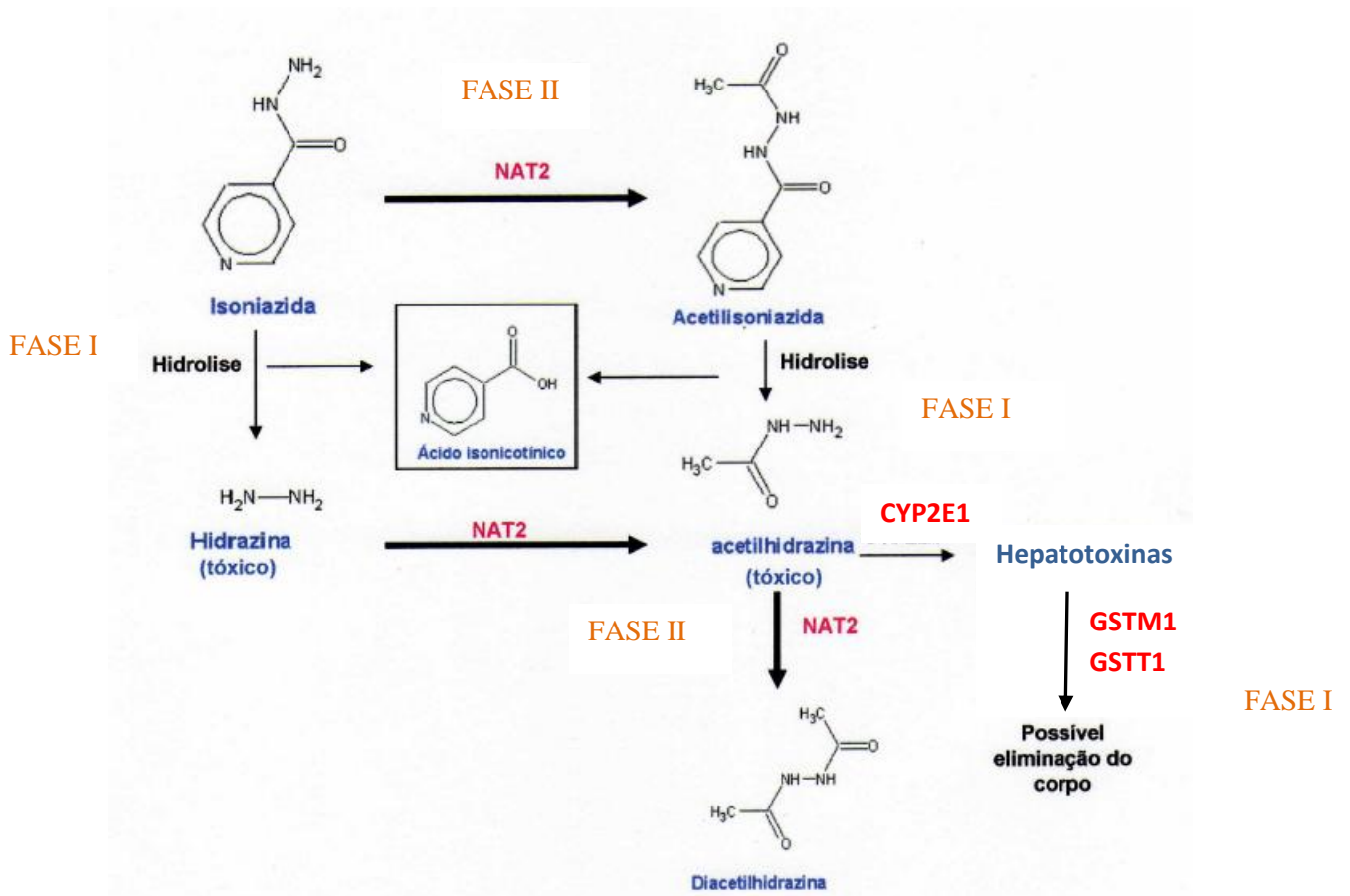


Figura 1: Rota metabólica sugerida para a isoniazida no fígado humano, com as enzimas participantes (Adaptado de Roy *et al.*)

1.6 FARMACOGENÔMICA

Um fármaco produz diferentes respostas em diferentes pessoas. O perfil genético é responsável por muitas dessas variações. Há inúmeras razões que explicam a ação ideal, nociva ou ineficiente de um medicamento, por exemplo, a prescrição incorreta ou a interação da droga com outras substâncias. Mesmo com muitas causas de origem fisiológica e ambiental, a absorção, distribuição e metabolismo de um fármaco, podem ser determinados por fatores genéticos. O estudo das variações genéticas que afetam a resposta a um fármaco é chamada de farmacogenética ou farmacogenômica. Não há, na literatura, um acordo preciso sobre a terminologia, e os dois termos são comumente intercambiados. Mas é fato que o termo ‘farmacogenômica’ foi introduzido durante a transição da genética para a genômica e deve representar abordagens usando o genoma completo ou um número substancial de genes para identificar, por exemplo, alvos hipotéticos para um fármaco ou doença, ou diferenças em larga escala nos padrões de expressão em resposta as drogas (NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS, 2003; EICHELBAUM *et al.*, 2006).

Estima-se que a genética explica, em até 30% dos casos, as diferenças individuais no metabolismo e resposta aos fármacos. Entretanto, para certos fármacos ou classes destes, a genética tem uma importância muito maior, sendo responsável por 95% da variabilidade da disposição e efeitos dos fármacos (EICHELBAUM *et al.*, 2006).

A variação genética humana mais frequente se apresenta como polimorfismos de base única (SNPs). Os SNPs estão distribuídos de forma não aleatória ao longo do genoma humano e podem estar completamente ausentes em regiões altamente conservadas ou abundantes em regiões nas quais a diversidade genética é biologicamente importante (WJST & WERNER, 2006). A ocorrência de SNPs pode estar relacionada ao surgimento de uma reação adversa, e o perfil de SNPs de um indivíduo pode ser usado para calcular seu risco de sofrer reação adversa à um fármaco (GUZEY & SPIGSET, 2004).

Durante os últimos 50 anos de pesquisas em farmacogenética, aprendemos que as variações genéticas entre os indivíduos e fatores ambientais influenciam na eficácia de todos os medicamentos (DAAR & SINGER, 2005). Aprendemos também que a frequência de polimorfismos em alelos, genótipos e haplótipos em “farmacogenes” (genes de relevância farmacológica) podem variar significativamente entre populações classificadas por “raça”, etnicidade ou continente de origem (SUAREZ-KURTZ, 2008). Sabemos agora

que enzimas de metabolismo são afetadas não somente por SNPs, mas também por outros tipos de variações, como duplicação e deleção de genes, mutações em genes envolvidos na regulação e variações no número de cópias. Definindo as frequências e distribuição desses polimorfismos, além de observar a grande variação entre populações, poderemos apontar traços predominante expressos em populações específicas. Muitas dessas particularidades e diferenças entre os grupos ou populações devem ter importantes implicações na medicina e saúde pública (DAAR & SINGER, 2005).

Cerca de 80% dos fármacos dependentes de enzimas metabolizadoras de fase I são metabolizados por enzimas do Citocromo P450 (CYP) (EICHELBAUM *et al.*, 2006;INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 2007). Citocromo P450 é uma superfamília de hemoproteínas com importante papel na biotransformação de vários xenobióticos e compostos endógenos. As formas polimórficas de CYP respondem pelo desenvolvimento de um número significativo de reações adversas. O tratamento personalizado baseado em CYP deve ser relevante para 10-20% de todas as terapias medicamentosas. Além disso, o custo do tratamento para pacientes que apresentam variantes nos polimorfismos dos CYPs é muito mais alto do que para pacientes com alelos não-polimórficos (INGELMAN-SUNDBERG, 2004).

1.7. ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DA ISONIAZIDA

1.7.1. CYP2E1

CYP2E1 é uma das enzimas do Citocromo P450, pertencente à família 2, subfamília E, polipeptídio 1 (UMENO *et al.*, 1988;PIAO *et al.*, 2003). É expresso no fígado, em maior concentração na região centrolobular. É uma enzima razoavelmente conservada, provavelmente pelas importantes funções endógenas que desempenha. A regulação endógena de CYP2E1 é similar a das outras enzimas envolvidas na gliconeogênese: a expressão é reprimida durante a dieta normal e aumentada em situações de jejum e diabetes (BOZINA *et al.*, 2009). O gene *CYP2E1* está localizado no braço longo do cromossomo 10, possui 14776 pares de bases (pb) e 9 éxons (GenBank: J02843.1).

Polimorfismos em *CYP2E1* têm sido investigados com relação ao alcoolismo, doença pulmonar obstrutiva crônica, diversos tipos de câncer e hepatotoxicidade induzida por xenobióticos (KATO *et al.*, 1992;ARIF *et al.*, 2007;BOCCIA *et al.*, 2007;CHO *et al.*, 2007;LIU *et al.*, 2007;KHAN *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* indicaram que SNPs na região intrônica e região flanqueadora 5' de *CYP2E1* estavam relacionados a alteração do nível transcricional. Entretanto, esses resultados são contraditórios e nenhuma afirmação pode ser estabelecida (INGELMAN-SUNDBERG, 2004). LIU e colaboradores (2007) investigaram os níveis de mRNA de *CYP2E1* em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago e não viram relação entre expressão do mRNA e os polimorfismos em *CYP2E1* (LIU *et al.*, 2007). *CYP2E1* parece ser a única proteína de CYP regulada principalmente em nível pós-transcricional por xenobióticos como o álcool, acetona, isoniazida e prazol. Esses indutores parecem aumentar significativamente a meia-vida de *CYP2E1*, num processo que parece estar envolvido com a inibição da via de degradação proteossomal (PELKONEN *et al.*, 2008). Um exemplo da indução de *CYP2E1* pela isoniazida foi demonstrada por O'SHEA *et al.*, que observaram que pacientes com o perfil acetilador lento para NAT2 (principal via de metabolização) tinham maior concentração de isoniazida no corpo. (O'SHEA *et al.*, 1997;PELKONEN *et al.*, 2008).

Os polimorfismos mais estudados em *CYP2E1* são os alelos C no SNP -1293 G>C e T no SNP -1053 C>T, que formam o haplótipo *CYP2E1**5 (c2/c2), descritos como estando em total desequilíbrio de ligação (DL). O alelo selvagem é conhecido como *CYP2E1**1A ou c1 (*CYP2E1*, 2007). Estes polimorfismos foram associados com câncer colorretal em caucasianos (ZHOU *et al.*, 2010). Outro SNP em *CYP2E1* que vem sendo pesquisado há menos tempo localiza-se no intron 6 e apresenta uma substituição T>A em 7632, caracterizando o alelo *CYP2E1**6 (*CYP2E1*, 2007).

Estudos de epidemiologia molecular têm sido realizados para investigar a relação entre polimorfismos em *CYP2E1* e doenças ou resposta a xenobióticos. Entre as doenças mais pesquisadas estão câncer de mama (KHEDHAIER *et al.*, 2008), de pulmão de células não-pequenas (ZIENOLDDINY *et al.*, 2008) gástrico (BOCCIA *et al.*, 2007), colo-retal (ZHOU *et al.*, 2010), carcinoma de células escamosas de esôfago (LIU *et al.*, 2007) e doença pulmonar obstrutiva crônica (GASPAR *et al.*, 2004;ARIF *et al.*, 2007). Já em relação aos polimorfismos e exposição a produtos químicos ou drogas, entre os compostos

mais estudados são etanol, acetaminofen, benzeno, clorofórmio e n-nitrosaminas (NEAFSEY *et al.*, 2009).

1.7.2. GSTM1 E GSTT1

As glutiona S-transferases (GSTs) constituem outra classe de enzimas com importantes funções na detoxificação de diversos carcinógenos, compostos tóxicos e fármacos (ROY *et al.*, 2008). GSTs têm uma importante ação protetora contra radicais livres atuando através da conjugação com os metabólitos reativos tóxicos gerados pela biotransformação de fármacos e xenobióticos. Dessa forma, as enzimas GSTM1 e GSTT1, presentes na rota de metabolização da isoniazida, parecem desempenhar um papel essencial na prevenção da hepatotoxicidade (HUSSAIN *et al.*, 2003). Esses genes estão ausentes em uma representativa parcela da população, resultando na perda total da atividade enzimática. Indivíduos homozigotos para a deleção nos genes das GSTs possuem deficiência na atividade detoxificadora das enzimas, estando mais propensos a desenvolver hepatotoxicidade. Porém, indivíduos que possuem ao menos um alelo funcional apresentam atividade enzimática (ROY *et al.*, 2008).

O gene *GSTM1* possui 5926 pb e está localizado no cromossomo 1 em humanos. *GSTT1* possui 8091pb e encontra-se no cromossomo 22 humano. *GSTM1* é relevante na desativação de intermediários carcinogênicos derivados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *GSTT1* é altamente conservada durante a evolução e tem um importante papel na biotransformação de fase II de muitos fármacos e produtos químicos industriais, p.ex. drogas citostáticas, hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados. Muitas evidências sugerem que *GSTT1* e *GSTM1* humanas participam da desativação de espécies reativas de oxigênio que estariam envolvidas nos processos celulares de inflamação, envelhecimento e doenças degenerativas (BOLT & THIER, 2006). DALY (2010) buscou esclarecer, através da literatura, a influência de fatores genéticos em danos hepáticos induzidos por fármacos e sugeriu que indivíduos homozigotos para as deleções em *GSTM1* e *GSTT1* têm maior risco de sofrer hepatopatias devido à toxicidade gerada pela isoniazida, troglitazone e co-amoxiclav (DALY, 2010).

Muitos estudos foram realizados questionando a influência dos genótipos de *GSTM1* e *GSTT1* no desenvolvimento de câncer de mama, pulmão, colorretal, cérebro,

cabeça e pescoço, bexiga e fígado (HAYES *et al.*, 2005; BOLT & THIER, 2006; WHITE *et al.*, 2008). Indivíduos com a deleção homozigota em *GSTM1* ou *GSTT1* parecem estar em risco para câncer em uma pequena magnitude (odds ratios < 2), porém, parecem estar sob maior risco quando as deleções são encontradas combinadas com outros fatores genéticos (p.ex. polimorfismos em *CYP*) ou ambientais (p.ex. tabagismo) (BOLT & THIER, 2006; RUWALI *et al.*, 2009). Um exemplo sobre a combinação de fatores foi estabelecida por RUWALI e colaboradores (2009), que observaram um maior risco de desenvolver carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) em pacientes com o polimorfismo *CYP2E1**5 (O.R. 3,44) e *CYP2E1**6 (O.R. 1,76). Análises haplotípicas revelaram que indivíduos com os alelos variantes em ambos os polimorfismos de *CYP2E1* têm o risco aumentado em dez vezes. E o risco para HNSCC ainda é maior em casos combinando as variantes de *CYP2E1* com a deleção em *GSTM1*, ou a variante do gene *XRCC1*, ou o consumo de álcool e tabaco (RUWALI *et al.*, 2009). Em diversos estudos, *GSTM1* e *GSTT1* também foram alvos de associação com hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose. No estudo de LEIRO *et al.* (2008), espanhóis com a deleção do gene *GSTT1* estavam significativamente sob maior risco de desenvolver hepatotoxicidade (LEIRO *et al.*, 2008). Já no estudo de ROY *et al.* (2001) realizado na Índia, a deleção em *GSTM1* estava significativamente associada com hepatotoxicidade (ROY *et al.*, 2001).

1.7.3. NAT2

A N-acetil transferase 2, enzima de conjugação de fase II, é a primeira enzima envolvida no mecanismo de desativação da INH. O gene *NAT2* está localizado no cromossomo 8, possui uma região codificante de 870 pb e é expresso principalmente no fígado e intestinos.

Os SNPs em *NAT2* têm sido extensivamente estudados em populações de variadas origens étnicas. Os alelos ou haplótipos de *NAT2* possuem uma combinação de polimorfismos associadas com fenótipos de acetilação rápida ou lenta. A identificação do perfil da acetilação em indivíduos ou populações é um valioso fator prognóstico de susceptibilidade, podendo servir como ferramenta para ajuste de dose terapêutica e escolha de fármacos apropriados (POSSUELO, 2008).

1.8. JUSTIFICATIVAS

O Brasil tem mostrado nos últimos anos sua luta para que as metas do “*Segundo Plano Global para Acabar com TB no Mundo (2006-2015)*” da parceria *Stop TB* sejam alcançados. Esse empenho pode ser conferido nas “III Diretrizes para tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia”, que revisou de forma crítica a literatura científica sobre tuberculose e apresentou aos profissionais da área de saúde as ferramentas mais atuais para o combate da doença no país. Uma das recomendações foi a redução da dose da isoniazida. (CONDE *et al.*, 2009). Nada mais sensato que apoiar esse envolvimento contribuindo com pesquisas na área da farmacogenética e sua promissora aplicação clínica.

Em tuberculose, poucos estudos farmacogenéticos têm sido realizados. Este estudo abrange um número maior de polimorfismos nos genes que codificam as enzimas envolvidas na rota de metabolização da isoniazida, em pacientes brasileiros, do que em outros trabalhos já publicados. Assim, torna-se de grande importância esse tipo de estudo para que posteriormente seja possível a realização de ajustes de dose terapêutica com o objetivo de reduzir os índices de reações adversas, responsáveis por uma forte oneração do sistema de saúde pública e por afetar negativamente a qualidade de vida do paciente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo foi elaborado com o objetivo de estimar a frequência dos polimorfismos nos genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* e a possível relação desses polimorfismos com hepatotoxicidade em um grupo de pacientes em tratamento para tuberculose no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon, em Porto Alegre.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Identificar os genótipos para os polimorfismos de *CYP2E1*: -1053C>T, -1293G>C e 7632T>A e *GSTM1* e *GSTT1* (genótipo nulo/não nulo).
- b) Estimar a frequência de polimorfismos nos genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1*.
- c) Avaliar o desequilíbrio de ligação entre os alelos.
- d) Avaliar a relação entre genótipo/haplótipo e desenvolvimento de reações adversas.
- e) Correlacionar genótipos com dados epidemiológicos disponíveis nas fichas e prontuários médicos dos pacientes em estudo.
- f) Analisar fatores de risco para desenvolvimento de hepatotoxicidade nos pacientes tratados no ambulatório.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os fluxogramas abaixo descrevem de forma sucinta todas as etapas que compreendem este estudo, incluído as etapas que compõem o manuscrito. Os textos presentes nesta seção referem-se aos resultados adicionais, que não fazem parte do manuscrito.

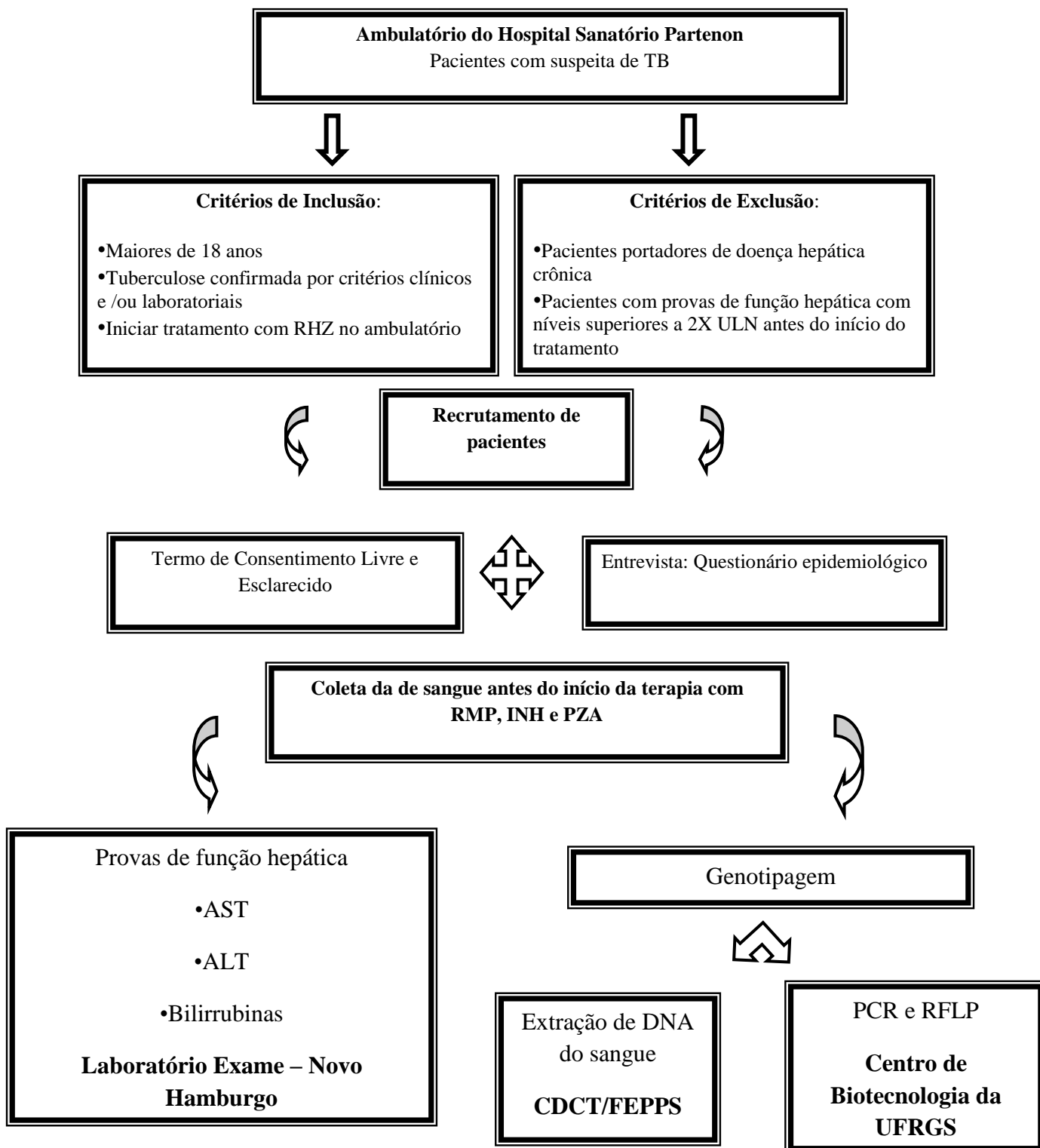


Figura 2: Fluxograma da Logística Operacional, Coleta e Análise de Dados do estudo.

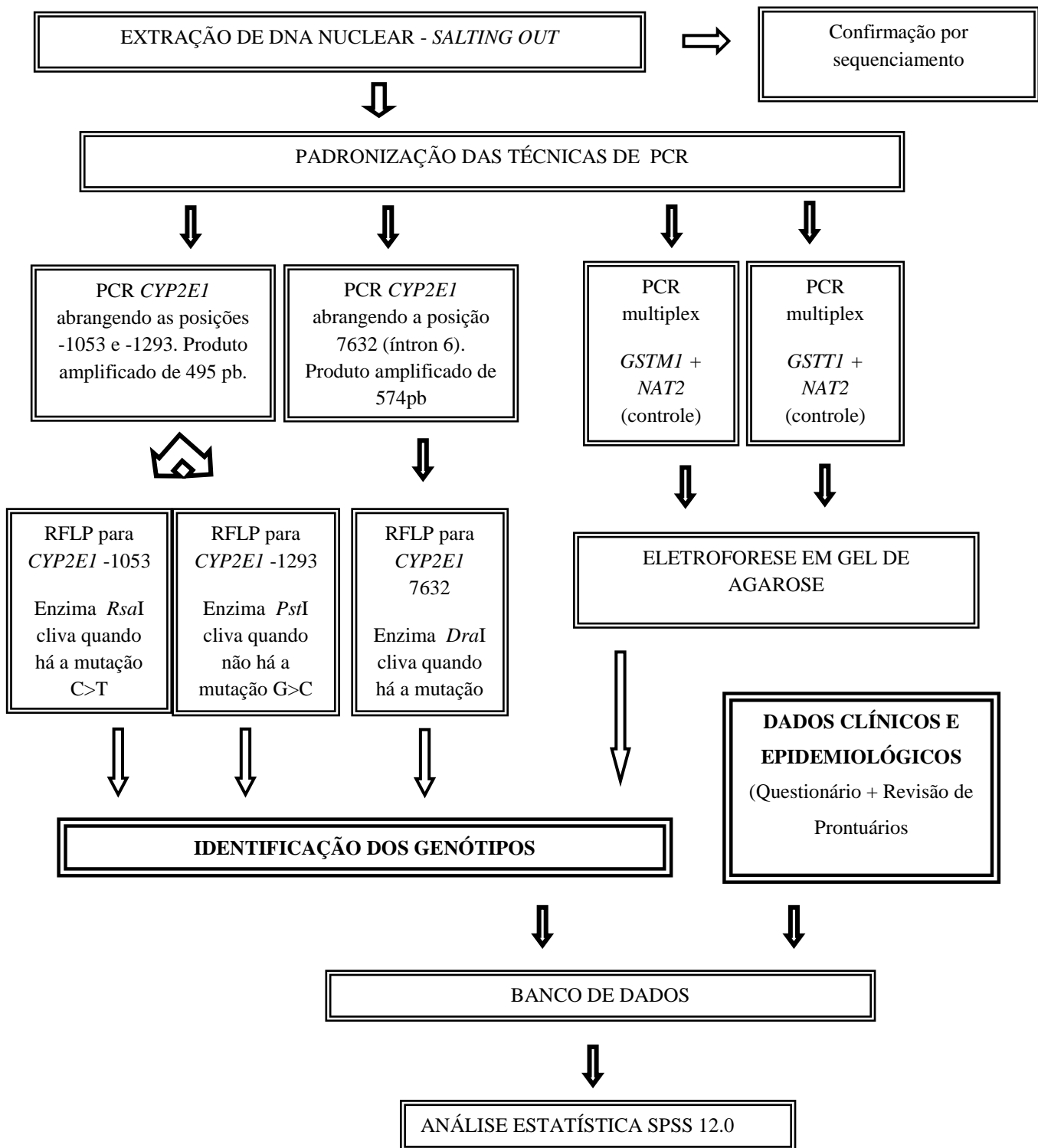


Figura 3: Fluxograma dos métodos realizados até a obtenção do genótipo e análise dos resultados.

3.1. DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foi realizado um estudo longitudinal de coorte prospectivo com pacientes admitidos para iniciar tratamento para tuberculose no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon, hospital de referência para o tratamento da tuberculose, localizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Este ambulatório atende uma parcela da população da área leste de Porto Alegre, residente nos bairros Agronomia, Lomba do Pinheiro e Partenon, representando cerca de 30% do total de casos novos notificados na cidade.

De agosto de 2005 a agosto de 2007 foram admitidos em torno de 700 pacientes para realizar tratamento para tuberculose nesta unidade de saúde. Foram incluídos nesse estudo 245 pacientes. A população é praticamente a mesma estudada por POSSUELO e colaboradores em 2008 (POSSUELO *et al.*, 2008), porém, 14 pacientes tiveram de ser retirados por análises inconclusivas nas técnicas de biologia molecular. Cinco novos pacientes, que iniciaram tratamento após o fechamento do grupo de estudo de POSSUELO *et al.* (2008), foram adicionados ao presente estudo.

3.2. PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA E SOROLOGIA

Os níveis das enzimas hepáticas foram dosados, através do soro, pelo método colorimétrico no analisador automático Dimension AR (DADE Behring, Alemanha), e os valores foram confirmados pelo mesmo método no equipamento Cobas Integra 400 Plus (Roche, Alemanha). A comparação entre as provas de função hepática foi feita comparando-se os níveis basais (anteriores ao tratamento) com o valor durante o pico (o nível mais elevado após início do tratamento). Os marcadores das hepatites virais [antígeno para hepatite B (HbsAg) e anticorpos anti-HCV e anticorpos anti-HIV] foram analisados por kits de teste imunoenzimático ELISA. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

3.3. REAÇÕES ADVERSAS GASTROINTESTINAIS E DEFINIÇÃO DE HEPATOTOXICIDADE

Náusea, vômito, anorexia, e/ou dor abdominal foram considerados reações adversas gastrointestinais. O critério utilizado para o diagnóstico de hepatotoxicidade foi: elevação das provas de função hepática; AST e/ou ALT acima de três vezes o limite superior de referência (ULN) (valor de referência: 40 e 65 U/L, respectivamente) e/ou valores de bilirrubina total acima de 2 mg/dL (valor de referência: 0,1 a 0,6 mg/dL) na presença de sintomas gastrointestinais, com a normalização dos níveis séricos de ALT após a descontinuação do tratamento antituberculose. Este critério é usado rotineiramente pelos médicos pneumologistas e gastroenterologistas do Hospital Sanatório Partenon e estão de acordo com as recomendações do Consenso Brasileiro de Tuberculose (CASTELO FILHO *et al.*, 2004). Casos de hepatotoxicidade baseado nos critérios do Consenso Internacional (BÉNICHOU, 1990) também foram considerados (ALT maior que duas vezes o ULN). Os pacientes diagnosticados com hepatotoxicidade tiveram seu tratamento suspenso. Após o desaparecimento dos sintomas e normalização dos níveis das enzimas hepáticas, esses pacientes receberam um novo regime, compostos pelos fármacos estreptomicina (SM), IHN, e EMB pelos primeiros três meses, seguido por INH e EMB nos nove meses seguidos (esquema SHM). Nenhum paciente teve outro episódio de hepatotoxicidade após a re-introdução da terapia antituberculose.

3.4. INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM CYP2E1

A sequência utilizada como referência está disponível no GeneBank através do número de acesso JO2843 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os casos que apresentaram sítio de restrição, na região promotora, para as duas ou nenhuma das enzimas (ausência de DL) foram confirmados por sequenciamento.

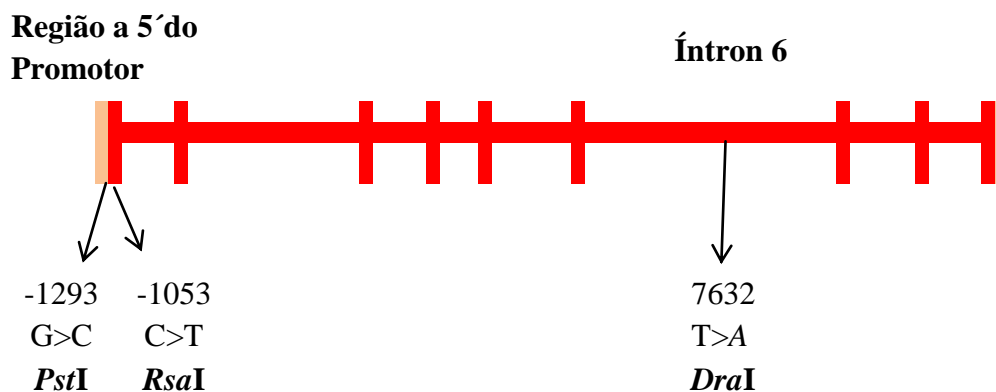


Figura 4: Esquema ilustrativo indicando os sítios polimórficos do gene *CYP2E1* com as respectivas enzimas de restrição.

3.5. INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM *GSTM1* E *GSTT1*

A identificação da presença ou ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* no DNA de cada paciente foi realizada através de uma PCR *multiplex* para cada gene, sendo que em ambas reações utilizou-se como controle interno um par de *primers* desenhados para amplificar um fragmento do gene *NAT2*. A frequência da deleção de *GSTT1* encontrada na população mostrou-se inferior em comparação a outros estudos com populações de Porto Alegre e do Brasil, suscitando dúvidas quanto a real amplificação do fragmento desejado. Para confirmar que o fragmento amplificado era de *GSTT1* e não de outra região do genoma, a PCR *multiplex* foi refeita com *primers* repetidamente usados na literatura.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Este estudo admitiu 245 pacientes. A média de idade foi 36,8 ($\pm 12,8$) variando de 18 a 83 anos, sendo oito pacientes maiores de 60 anos. Cento e sessenta e um (65,7%) eram do sexo masculino, 140 (57%) eram brancos, 39 (15,9%) faziam uso de álcool. Duzentos e cinco (83,7%) pacientes foram diagnosticados com tuberculose pulmonar, 32(13,1%) com tuberculose extrapulmonar, cinco (2%) com tuberculose pulmonar e extrapulmonar e outros três (1,2%) com tuberculose miliar. Com relação ao HIV, 64 (26,1%) pacientes eram positivos, e destes 20 (31,2%) usavam terapia antiretroviral. Todos esses pacientes utilizavam lamivudina, 14 (70%) também usavam efavirenz e 13 (65%) estavudina.

Ao analisarmos os resultados das provas de função hepática antes do início do tratamento, observamos que 13% dos pacientes tinham AST acima dos limites superiores normais, 6,2% apresentavam ALT alterada e 1,2% possuíam bilirrubinas alteradas. Nenhuma das alterações foi superior a duas vezes o limite superior normal.

A tabela 3 apresenta o desfecho do tratamento para os 245 pacientes, segundo o critério do corpo médico do Hospital Sanatório Partenon.

Tabela 3: Desfecho do tratamento para o total de pacientes.

Desfecho	Nº de pacientes	%
Cura	194	79,2
Abandono	28	11,4
Falência	6	2,4
Óbito	4	1,6
Alta por transferência*	13	5,3
Total	245	100

*Compreende pacientes redirecionados para completar o tratamento em outras unidade de saúde ou com mudança no diagnóstico de tuberculose.

4.2. ANÁLISES DOS DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM HEPATOTOXICIDADE

Quando foi avaliado o uso de medicação concomitante, observou-se que 100 (40,8%) pacientes utilizaram alguma medicação concomitante ao tratamento para tuberculose. Cerca de 18% dos pacientes apresentaram algum tipo de RAM. Entre os pacientes que faziam uso de outros medicamentos 22% apresentaram RAM.

4.3. GENOTIPAGEM

Os polimorfismos em *CYP2E1* foram identificados a partir da visualização em gel de agarose dos produtos amplificados e submetidos à clivagem com as respectivas enzimas de restrição. Os padrões dos genótipos estão exemplificados na figuras 5, 6 e 7.

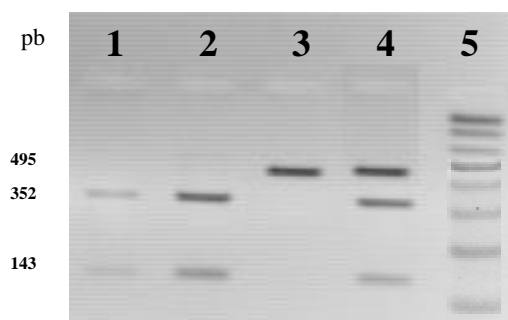


Figura 5: Perfis de RFLP da região -1053 *CYP2E1* após clivagem com *RsaI*. Após amplificação por PCR os fragmentos foram clivados com *RsaI* e analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Posições 1 e 2: genótipo selvagem (presença de sítio de clivagem). Posição 3: genótipo mutante (ausência de sítio de clivagem). Posição 4: genótipo heterozigoto (clivagem parcial). Posição 5: tamanho de fragmento (100 bp *ladder*). Os tamanhos dos fragmentos estão indicados na figura.

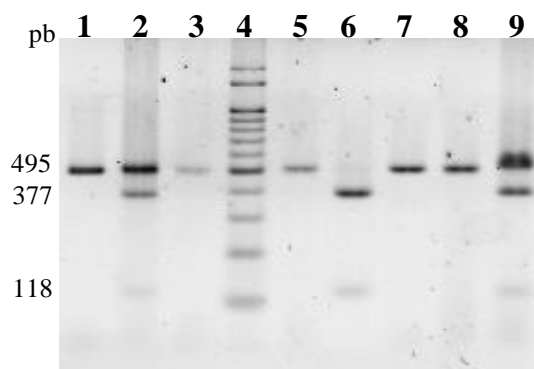


Figura 6: Perfis de RFLP da região *CYP2E1* -1293 após clivagem com *Pst*I. Após amplificação por PCR os fragmentos foram clivados com *Pst*I e analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Posições 1, 3, 5, 7 e 8: genótipo selvagem (ausência de sítio de clivagem). Posições 2 e 9: genótipo heterozigoto (clivagem parcial). Posição 6: genótipo mutante (presença de sítio de clivagem). Posição 4: marcador de tamanho de fragmento (100 bp *ladder*). Os tamanhos dos fragmentos estão indicados na figura.

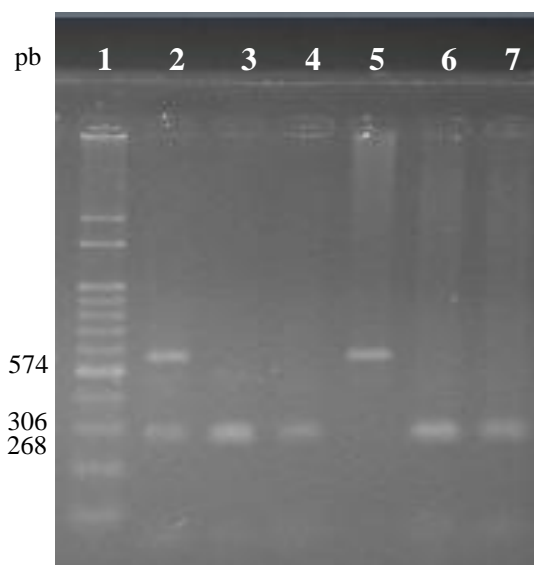


Figura 7: Perfis de RFLP da posição 7632 em *CYP2E1* após clivagem com *Dra*I. Após amplificação por PCR os fragmentos foram clivados com *Dra*I e analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Posição 1: marcador de tamanho de fragmento (100 bp *ladder*). Posição 2: genótipo heterozigoto (clivagem parcial). Posição 3, 4, 6 e 7: genótipo selvagem (presença de sítio de clivagem). Posição 5: genótipo mutante (ausência de sítio de clivagem). Os tamanhos dos fragmentos estão indicados na figura.

Os genótipos de *GSTM1* e *GSTT1* foram obtidos através de PCR *multiplex*. A amplificação somente do controle indicava a deleção do gene. Os padrões estão exemplificados na figuras 8 e 9.

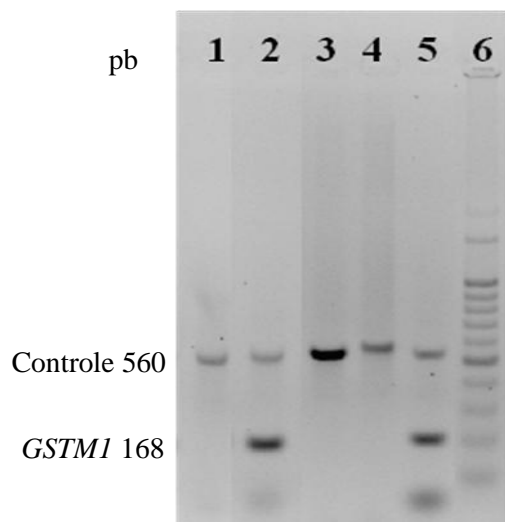


Figura 8: Perfis dos genótipos de *GSTM1* após amplificação e análise em gel de agarose 1%. Posições 1, 3 e 4: genótipo nulo (amplificação somente do controle interno). Posições 2, e 5: genótipo selvagem ou heterozigoto (presença do gene). Posição 6: marcador de tamanho de fragmento (100 bp *ladder*). Os tamanhos dos fragmentos estão indicados na figura.

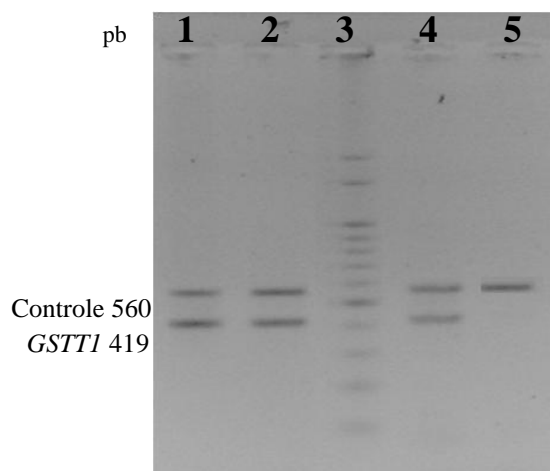


Figura 9: Perfis dos genótipos de *GSTT1* após amplificação e análise em gel de agarose 1%. Posições 1, 2 e 4: genótipo selvagem ou heterozigoto (presença do gene). Posição 3: marcador de tamanho de fragmento (100 bp *ladder*). Posição 5: genótipo nulo (amplificação somente do controle interno). Os tamanhos dos fragmentos estão indicados na figura.

4.4. POLIMORFISMOS EM *CYP2E1*, *GSTM1* E *GSTT1* E HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE

O manuscrito apresentado a seguir como corpo principal desta dissertação, intitulado *POLYMORPHISMS IN CYP2E1, GSTM1 AND GSTT1 AND ANTI-TUBERCULOSIS DRUG-INDUCED HEPATOTOXICITY*, será submetido ao periódico *European Journal of Clinical Pharmacology*.

O manuscrito apresenta os resultados das frequências genotípicas de *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* para a população estudada. Esses polimorfismos foram analisados em associação com o perfil acetilador de *NAT2*, descrito na tese de doutorado de Lia Gonçalves Possuelo. O manuscrito também mostra características clínicas dos pacientes e discute as variáveis HIV positivo e níveis elevados de transaminases basais como fatores de risco para o desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose.

A autora principal participou de todas as etapas que originaram o manuscrito. Lia G. Possuelo, na época aluna de doutora do PPG Ciências Biológicas: bioquímica, UFRGS, foi a principal responsável pelas coletas e entrevistas dos pacientes, genotipagem de *NAT2*, montagem do banco de dados. Teve participação essencial para genotipagem de *CYP2E1* e nas análises estatísticas. Andrezza W. Ribeiro, iniciação científica, participou nas coletas e entrevistas dos pacientes, extração do DNA e genotipagem de *CYP2E1*. Tatiana S. Gregianini, servidora e pesquisadora da FEPPS, colaborou na idealização do projeto e implementação das técnicas de biologia molecular. Carla A. Jarczewki, médica pneumologista do Hospital Sanatório Partenon, ajudou no encaminhamento e avaliação clínica dos pacientes. Mara H. Hutz, professora e pesquisadora do Departamento de Genética da UFRGS, colaborou na análise dos polimorfismos, análises estatísticas e discussão. Maria Lúcia Rossetti, diretora do CDCT, ofereceu apoio técnico para os experimentos executados nesse setor. Arnaldo Zaha, professor e pesquisador do Departamento de Biotecnologia da UFRGS, é orientador da autora principal, e participou da discussão dos resultados em todas as etapas.

POLYMORPHISMS IN *CYP2E1*, *GSTM1* AND *GSTT1* AND ANTI-TUBERCULOSIS DRUG-INDUCED HEPATOTOXICITY

de Brito TC^{1,2}, Possuelo LG⁵, Ribeiro AW², Gregianini TS², Jarczewski CA³, Hutz MH⁴, Rossetti MLR², Zaha A¹

¹Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

²Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa e Saúde, Porto Alegre, Brazil

³Hospital Sanatório Partenon, Porto Alegre, Brazil

⁴Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

⁵Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Brazil

ABSTRACT

Anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity has been linked to polymorphisms in genes encoding drug metabolizing enzymes. *N*-acetyltransferase 2 (NAT2), cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and glutathione *S*-transferase (loci *GSTM1* and *GSTT1*) are involved in the metabolism of isoniazid, the most toxic drug in the treatment for tuberculosis (TB). This study was designed to determine the frequency and to evaluate whether polymorphisms at *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes are related to drug response, also searching for clinical risk factors for hepatotoxicity. A total of 245 Brazilian patients under treatment for TB were genotyped using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods. The frequencies for the *CYP2E1* polymorphic alleles *RsaI*, *PstI* and *DraI* are 8%, 8,5% and 12%, respectively. *GSTM1* and *GSTT1* genes are deleted in 42.9% and 12.4% of the population. Fifteen patients (6.1%) developed hepatotoxicity. Patients *CYP2E1* without any mutations, having NAT2 slow acetylator profile, are at higher risk of drug-induced hepatotoxicity. *Null* genotype for *GSTM1* and *GSTT1* showed no influence in drug response. HIV and high baseline levels of transaminases are independent risk factors for hepatotoxicity in this population.

INTRODUCTION

Anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity is an important clinical problem as the most serious adverse effect during tuberculosis (TB) treatment (TOSTMANN *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2009). The 6-month therapy consists in the combination of the drugs isoniazid (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamide (PZA) and ethambutol. The last one has been added to the Brazilian first-line therapy in 2009 (CONDE *et al.*, 2009). Patients often suffer adverse drug reactions and it is of increasing concern hepatotoxicity may be due to additive or synergistic effects of INH and RMP (YEW & LEUNG, 2006). The frontline drug, INH, has been studied extensively. In the human liver, INH is first acetylated by *N*-acetyltransferase 2 (NAT2) into acetylhydrazine, then oxidized into toxic intermediaries by cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) (HUANG *et al.*, 2003). The toxic compounds produced are detoxified by further acetylation by NAT2 and by conjugation reactions catalyzed by glutathione *S*-transferase enzymes (GST). Frequency and severity of anti-TB drug-induced hepatotoxicity is variable and unpredictable. Secondary pathways and metabolizing profile takes part in an unbalance between hepatotoxins production and their detoxification in the liver (ROY *et al.*, 2001; LEIRO *et al.*, 2008).

Risk factors for drug-induced hepatotoxicity, such as HIV, hepatitis B and C co-infection, elevated baseline transaminases, old age and female sex (FERNÁNDEZ-VILLAR *et al.*, 2004; SAUKKONEN *et al.*, 2006; POSSUELO *et al.*, 2008), are usually implicated but seems to vary among populations.

Genetic factors can also have a large influence in drug response. Enzymes from cytochrome P450 (CYP) are responsible for about 80% of all phase I drug metabolism (EICHELBAUM *et al.*, 2006). *CYP* genes are highly polymorphic and this genetics differences has been associated with altered gene expression and drug adverse reactions (INGELMAN-SUNDBERG, 2004) (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 2007). Polymorphisms in *CYP2E1* has been investigated in relation to alcoholism, chronic obstructive pulmonary disease, alcoholic liver cirrhosis, in numerous types of cancer and anti-TB drug-induced hepatitis (KATO *et al.*, 1992; ARIF *et al.*, 2007; BOCCIA *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2009).

Besides CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 enzymes are involved in the detoxification pathway of INH toxic metabolites. Deficiency in GST activity, caused by gene deletion, may modulate susceptibility to drug- and xenobiotic-induced

hepatotoxicity(ROY *et al.*, 2001). Our previous study of *NAT2* polymorphism demonstrated that slow acetylation profile is associated to anti-TB drug-induced hepatotoxicity(POSSUELO *et al.*, 2008).

Gene-environmental factors diverge among individuals and populations. The interest in understanding human genomic variations makes crucial the characterization and study of the geographical distribution of human genetic diversity. The interethnic admixture observed in Americas makes its populations especial and valuable for pharmacogenomics approaches(SUAREZ-KURTZ & PENA, 2006).

This study was designed to determine the frequency and to evaluate whether polymorphisms at *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes are related to drug response, also searching for clinical risk factors for hepatotoxicity, in a population under treatment for TB with isoniazid, rifampicin and pyrazinamide (RHZ) from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Patients

This prospective study was carried out between August 2005 and August 2007 and 245 unrelated patients with newly diagnosed TB were included. Inclusion criteria were: patients aged over 18 years who were newly diagnosed with active TB and joined a daily treatment with INH, RMP, and PZA for the first 2 months followed by INH and RMP for additional 4 months. The population is almost the same studied by Possuelo and cols (POSSUELO *et al.*, 2008). In this study were included five new patients and other 14 were excluded due to lack of sample to new analysis. Details about treatment, liver function tests and serology, and hepatotoxicity criteria are described in Possuelo *et al* (POSSUELO *et al.*, 2008).

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

Genotyping of *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1*

Genomic DNA was extracted from a whole blood sample of each patient according to the *Salting Out* method, modified from Miller *et al* (MILLER *et al.*, 1988). Polymorphisms in *CYP2E1* were detected using PCR-RFLP method. Amplification was performed in a thermocycler PTC-100TM (MJ Research Inc) and PCR details are described in Table 1. After amplification of the 5' flanking region it was digested with endonucleases *RsaI* (5U New England BioLabs) and *PstI* (4U, Invitrogen, Brazil), at positions -1053C>T and -1293G>C, respectively. A region in intron 6 of *CYP2E1* (7632T>A), was amplified and digested with *DraI* (8U, New England BioLabs). Wild type *CYP2E1* allele (*1A) has restriction sites for *RsaI* and *DraI* but not for *PstI*. The presence of restriction sites yielded two fragments of 352 and 143 bp for *RsaI* restriction digest, 377 and 118 for *PstI*, and 268 and 306 for *DraI* restriction digest. Digested products were visualized by electrophoresis with 2.5 % agarose gel stained with ethidium bromide or GelRedTM. Presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1* were observed by performing two multiplex PCR. NAT2 genotyping method is described in Possuelo *et al*(POSSUELO *et al.*, 2008).

GSTT1 amplification was performed twice to exclude the possibility of amplification of a nucleotide sequence from a different region in the genome. The idea rose because the frequency of gene deletion in the present population showed to be unexpectedly lower than usually observed in other populations. For the second analysis were used primers established for other authors (LEIRO *et al.*, 2008). *GSTs* were considered present when it was amplified fragment plus *NAT2* fragment, used as intern control, was observed after electrophoresis in an agarose gel 2% stained with GelRedTM. If the 560 bp *NAT2* fragment was the only visualized in the gel, it means *GST* was deleted.

Statistical analysis

Allele frequencies at individual SNPs were estimated by counting. Linkage disequilibrium (D) and D' (the relative magnitude of D as compared to its theoretical maximum) were calculated also using the software program MULTIPLE LOCUS HAPLOTYPE ANALYSIS ver. 2.0 (LONG *et al.*, 1995; JC, 1999).

All statistical analyses were performed using the SPSS ver. 12.0 statistical program (SPSS, Chicago, IL). Values are expressed as means \pm standard deviation (SD) or as numbers and percentages. Group comparisons for categorical variables were carried out using the χ^2 test, while Student's t test was used for the analysis of continuous variables. Relative risk (RR) and confidence intervals (CI=95%) were calculated. A p value ≤ 0.05 was considered significant.

Table 1: Description of primers sequence, PCR conditions, polymorphisms and restriction enzymes.

Genome region	Primer sequence / []	[MgCl ₂]	Annealing temperature	[Taq DNA polymerase]	Volume reaction	Number of cycles	Amplified fragment size	Polymorphisms
CYP2E1 5' flanking region	F 5'- CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3' R 5'-CCCTCTTCCACCTTCTATGAA-3' 30 pmol	0,9 mM	60°C	5U*	50 µl	35	495 bp	-1293G>C (<i>Pst</i> I) -1053C>T (<i>Rsa</i> I)
CYP2E1 Intron 6	F 5'- GAAGTTATTTCCCCCAAG AAAG -3' R 5'- CTGATTCCTGCTCTGTTGTCAG -3' 12 pmol	1,5 mM	62°C	5U*	50 µl	34	559 bp	7632 T>A (<i>Dra</i> I)
GSTM1	F 5'- GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC -3' R 5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTGG -3' 10 pmol	0,6 mM	55°C	0,5U**	15 µl	31	168 bp	Gene deletion
GSTT1-A	F 5'- GGTGGAAGGGACAAGGTAGT -3' R 5'- TTAAGTGCTGACCTGGGAAG -3' 14 pmol	0,6 mM	63°C	0,5U**	15 µl	34	419 bp	Gene deletion
GSTT1- B	F 5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC -3' R 5'- TCACCGGATCATGGCCAGGCA -3' 14 pmol	0,6 mM	63°C	0,5U**	15 µl	34	430 bp	Gene deletion
NAT2	EF 5'-TTAGTCACACGAGGAAATCAAA-3' IR 5'TGGTCCAGGTACCAGATTCC-3'	NAT2 was used as internal control in a multiplex PCR with GSTM1 or GSTT1. PCR conditions are in accordance of above described for those genes.				560 bp	191A, 282T, 341C, 481T, 590A, 803G, 857A	

*Taq DNA polymerase Cenbiot, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

**Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen, Brazil

RESULTS

1. Patients characteristics

Fifteen patients (6.1%) developed anti-TB drug induced hepatotoxicity (Table 2). All of them have their treatment switched to streptomycin, isoniazid and ethambutol, an alternative treatment to RHZ used in Rio Grande do Sul State in the occurrence of anti-TB drug-induced hepatotoxicity. None of the patients had a new episode of hepatotoxicity with the new regimen. Co-medication during TB treatment was used by 100 patients (40.8%). Of the 64 HIV-positive patients, 33 (51%) used co-medication and 3 of them developed hepatotoxicity (9%). ADR during treatment was observed in 48 (19.6%) patients.

At the present study, only the means for AST and ALT baseline differ considerably between patients with and without hepatotoxicity. HIV and extrapulmonary TB are significantly associated with hepatotoxicity as well. The demographical, clinical and laboratory data of patients with hepatotoxicity are show in Table 3.

Table 2: Description of all antituberculosis drug-induced hepatotoxicity cases.

Case	Sex	Time (days)^a	Age (years)	Bilirubin peak (mg/dL)	AST/ALT Peak (U/L)	Risk factors^b
1	F	13	27	0.60	148/705	1
2	M	15	66	1.5	857/548	-
3	F	17	38	0.72	233/429	1, 3, 5
4	M	14	31	1.05	275/503	2, 3,5
5	F	11	42	4.56	75/318	1
6	F	11	49	3.72	96/398	1, 3, 4
7	M	14	44	1.09	62/309	3
8	M	13	37	1.6	157/197	3, 4
9	F	14	19	1.35	134/406	1
10	M	8	30	1.6	153/254	3, 4
11	F	8	51	0.82	316/392	1, 2
12	M	17	46	0.61	234/804	3
13	M	13	25	0.42	339/188	
14	F	90	25	1.61	221/492	1, 3
15	F	5	27	0,69	93/85	1

^aTime until diagnosis of hepatotoxicity. ^bRisk factors: 1) female sex, 2) HCV, 3) HIV, 4) HAART, 5) alcohol abuse. F= female; M= male; AST= aspartate transaminase; ALT= alanine transaminase; Peak= highest level during treatment.

Table 3: Univariate analysis of clinical risk factors for hepatotoxicity development.

	Hepatotoxicity		Total n=245 (%)	p	RR (CI 95%)
	Yes n= 15 (%)	No n= 230 (%)			
Female	8 (53.3)	76 (33)	84 (34.3)	0.2	0.43 (0.15-1.23)
Alcohol	2 (13.3)	37 (16)	39 (15.9)	1.0	0.8 (0.17-3.7)
HCV	2 (13.3)	41 (17.8)	43 (17.6)	0.5	0.71 (0.15-3.3)
HBV	1 (6.7)	3 (1.3)	4 (1.6)	0.2	5.4 (----)
HIV	8 (53.3)	56 (24.3)	64 (26.1)	0.03	3.5 (1.23-10.2)
HAART	3 (20)	17 (7.4)	20 (8.1)	0.1	3.13 (1.6-13.7)
White skin color	11 (73.3)	129 (56)	140 (57.1)	0.3	0.5 (0.14-1.5)
Extrapulmonary TB	6 (40)	34 (14.8)	40 (16.3)	0.02	3.8 (1.3-11.5)
Mean Age (± DP)	38.1 (±12.79)	36.8 (±12.8)	36.8 (±12.8)	0.7	----
BMI (kg/m ²)	21.3 (±3.1)	20.7 (±3.3)	20.7 (± 3.2)	0.2	----
AST (U/L) baseline	41.9 (±36.2)	26.5 (±16)	28.1 (±20.3)	0.007	-----
ALT (U/L) baseline	40.5 (±32.6)	28,6 (±19.1)	29.8 (±20.1)	0.04	-----
Total bilirubin (mg/dL) baseline	0.5 (±0.18)	0.4 (±0.28)	0.4 (±0.27)	0.6	-----
AST (U/L) peak	187.9 (±89.3)	37.8 (± 78.9)	52.6 (±91.4)	<0.001	-----
ALT (U/L) peak	419.8 (±182.9)	43.5 (±54.8)	80.5 (±135.8)	<0.001	-----
Total bilirubin (mg/dL) peak	1.2 (±0.9)	0.4 (±0.6)	0.47 (±0.7)	<0.001	-----

HAART- Highly active antiretroviral therapy; HIV- Human immunodeficiency virus; HC(B)V- Hepatitis C(B) virus; CI- Confidence interval; AST- Aspartate transaminase; ALT- Alanine transaminase; peak- the highest level after commencing the treatment.

2. Genotyping analysis

Two polymorphisms were detected at the 5' flanking region of *CYP2E1*. At position -1053 (*RsaI* site), 210 (85.7%) patients were genotyped as *1A/*1A (wild-type), 31 (12.7%) *1A/*5B (heterozygous) and 4 (1.6%) *5B/*5B (mutant). At position -1293 (*PstI* site), 208 (84.9%) were *1A/*1A (wild-type), 32 (13.1%) *1A/*5B (heterozygous) and 5 (2%) *5B/*5B (mutant). For polymorphism in intron 6, 191 (78%) patients were genotyped as *1A/*1A (wild-type), 49 (20%) *1A/*6 (heterozygous) and 5 (2%) *6/*6

(mutant). The *GSTM1* null mutation was found in 105 patients (42.9%) and *GSTT1* null genotype in 30 patients (12.2%). The results of a linkage disequilibrium test carried out with *CYP2E1* SNPs are shown in Table 4.

Table 4: Pairwise LD values between SNPs in *CYP2E1*. Upward triangle is p -value and downward triangle is pairwise (D').

p -values	<i>RsaI</i> *5B	<i>PstI</i> *5B	<i>DraI</i> *6
<i>RsaI</i> *5B		0.000	0.000
<i>PstI</i> *5B	0.972		0.000
<i>DraI</i> *6	0.940	0.887	

3. Correlation among clinical factors, genotypes and hepatotoxicity

Among the 15 patients with hepatotoxicity, none is homozygous mutant for *CYP2E1* and only one has both *GST* deleted. In these patients, no difference is observed for the polymorphism frequencies in relation to all patients.

Combined analysis of the polymorphisms in *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes was performed but no synergistic effect was observed. When the *NAT2* slow phenotype is combined with *CYP2E1* *RsaI* *1A/*1A genotype, the association with hepatotoxicity got stronger (Table 5).

Analysis of liver function tests before starting treatment shows that 13% of patients had AST over ULN, 6.2% had altered levels of AST and 1.2% had alteration of bilirubins. Among patients with altered levels of AST before treatment, 25% was 3 fold or more the normal limit.

Levels of AST, ALT and total bilirubin after 30 days of treatment were significantly higher in patients homozygous for the *RsaI* *1A allele (data not show).

Table 5: Genotype characterization of the *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* and acetylation profile of *NAT2* in tuberculosis patients with and without hepatotoxicity.

<i>CYP</i> and <i>GST</i> Genotype / Acetylator status	Hepatotoxicity		Total N=245 (%)	<i>P</i>	RR (95% CI)
	Yes N=15 (%)	No N=230 (%)			
<i>CYP2E1 PstI</i>				1.0	0.85 (0.18-3.56)
*1A	13 (86.7)	195 (84.8)	208 (84.9)		
*1A/*5B + *5B	2 (13.3)	35 (15.2)	37 (15.1)		
<i>CYP2E1 RsaI</i>					0.41 (0.05-3.23)
*1A	14 (93.3)	196 (85.2)	210 (85.7)	0.7	
*1A/*5B + *5B	1 (6.7)	34 (14.8)	35 (14.3)		
<i>CYP2E1 DraI</i>				1.0	0.83 (0.22-3.06)
*1A	12 (80)	179 (77,8)	191 (78)		
*1A/*6 + *6	3(20)	51 (22,2)	54 (22)		
<i>GSTM1</i> null	6 (40)	99 (43)	105 (42.9)	1.0	0.88 (0.30-2.56)
<i>GSTT1</i> null	2 (13.3)	28 (12.2)	30 (12.4)	1.0	1.1 (0.23-5.17)
<i>GSTM1</i> + <i>GSTT1</i> null	1 (6.7)	12 (5.2)	13 (5.3)	0.57	1.3 (0.15-10.7)
<i>NAT2</i> slow	9 (60)	56 (24.3)	65 (26.5)	0.03	5.46 (1.75-16.98)
<i>NAT2</i> slow + <i>GSTM1</i>null	2 (13.3)	46 (20)	48 (19.6)	0.7	0.6 (0.13-2.8)
<i>NAT2</i> slow + <i>CYP RsaI</i>*A	9 (60)	49(21.3)	58(23.7)	0.002	5.5 (1.88-16.3)
<i>NAT2</i> slow + <i>CYP RsaI</i>*1A + <i>CYP PstI</i>*1A + <i>CYP DraI</i>*1A	7 (46.7)	43 (18.7)	50 (20.4)	0.017	3.8 (3.3-11.06)

DISCUSSION

Our study shows the frequency of polymorphisms in *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1*, it's relation with anti-TB drug-induced hepatotoxicity and clinical risk factors for hepatotoxicity. The main finding in the present study is that the association between genotype and hepatotoxicity is only noted when analyzing *CYP2E1* wild-type in combination with NAT2 slow.

Many studies reported the two polymorphisms in the 5' flanking region of *CYP2E1* in complete linkage disequilibrium. In ours, as in the study by Kato *et al* [18], *RsaI* and *PstI* polymorphisms were not in total LD. Five patients do not have those polymorphisms linked: 3 were *RsaI* *1A/*1A and *PstI* *1A/*5B; one were *RsaI* *1A/*5B and *PstI* *1A/*1A and one were *RsaI* *1A/*5B and *PstI* *5B/*5B.

Earlier reports showed that the mutant allele *5B was associated with higher transcriptional activity, proteins levels and enzyme activity than the common wild type allele *1A(HAYASHI *et al.*, 1991;WATANABE *et al.*, 1994). But the opposite has been reported in newer studies. In the population studied by Huang and cols, wild-type patients (*1A/*1A) were at increased risk for anti-TB drug-induced hepatitis(HUANG *et al.*, 2003). Vuilleumier and cols, reported a significant association between the wild-type *CYP2E1* and elevated liver enzymes. However they did not observe a significant association with hepatitis induced by INH and *CYP2E1* genotypes(VUILLEUMIER *et al.*, 2006). The *CYP2E1* wild-type genotype is often associated with a high enzyme activity and high production of hepatotoxins(ROY *et al.*, 2008;TOSTMANN *et al.*, 2008), a good supporting for this work, in which patients with *RsaI* wild-type had higher liver enzymes levels, after treatment beginning. In a study with rats, administration of INH increased plasma concentration of hydrazine and *CYP2E1* activity, sometimes leading to hepatotoxicity(YUE *et al.*, 2004). In agreement with the study done by Cho(CHO *et al.*, 2007), we found no straight association between *CYP2E1* polymorphisms and hepatotoxicity. It was possible only when joining the three *CYP2E1* wild type genotypes with NAT2 slow profile.

The most similar *CYP2E1* frequencies to ours is from European-americans (92% *1A/*1A, 7% *1A/*5B and 1% *5B/*5B for *RsaI/PstI*; 10% *1A and 90% *6 for *DraI*)(ROY *et al.*, 2008). Polymorphisms in *CYP2E1* are present in higher frequencies in Asians than any

other population(GARTE *et al.*, 2001), carrying a frequency about 20-30% of the *5B allele(KHAN *et al.*, 2009). To our knowledge, this is the first report studying the polymorphic site for *DraI* in relation to anti-TB drug-induced hepatotoxicity. This polymorphism has been linked to different kinds of cancer(FERREIRA *et al.*, 2003;PARK *et al.*, 2003;FERREIRA *et al.*, 2006;LIU *et al.*, 2007;RUWALI *et al.*, 2009).

GSTs are a superfamily of enzymes involved in a range of biological detoxification processes. Whole *GSTM1* and *GSTT1* genes are deleted in a high percentage of the human population(BOLT & THIER, 2006) and this is expected to contributed to interindividual differences in response to xenobiotics(HAYES *et al.*, 2005). *GSTM1* and *GSTT1* deletions are best choices for drug-induced liver injury association studies(ROY *et al.*, 2001;HUSSAIN *et al.*, 2003;LEIRO *et al.*, 2008;HUANG, 2010).

In our study, *GSTM1* was deleted in almost 43% of the population, comparable to observed in studies with some Hispanics and European-American populations(LEIRO *et al.*, 2008;ROY *et al.*, 2008). *GSTT1* was deleted in 12.4% of the present population, a lower frequency than commonly described in European-American and Brazilian populations(GASPAR *et al.*, 2004;KVITKO *et al.*, 2006;ROY *et al.*, 2008;MAGNO *et al.*, 2009) but similar to Hispanics and Scandinavians(GARTE *et al.*, 2001;ROY *et al.*, 2008). Data shows a few associations between *GSTT1* (LEIRO *et al.*, 2008) and *GSTM1*(ROY *et al.*, 2001) null genotypes and hepatotoxicity. In our study no relation was observed.

It is widely know that Brazil has one of the most mixed populations in the world. But the southernmost state, Rio Grande do Sul, has its singular colonization. Portugueses from Azores were the very first immigrants arriving in the capital Porto Alegre, later has come immigrants from Spain, Italy, and Germany. The gene pool has also the contribution of African slaves and Amerindians. This mixing is barely exclusive from the South of the country, and genetics differences have been established by studies using ancestry informative markers(CALLEGARI-JACQUES *et al.*, 2003;MARRERO *et al.*, 2007;GUERREIRO-JUNIOR *et al.*, 2009).

The incidence of anti-TB drug-induced hepatotoxicity in our study was 6.1%. This rate of incidence varies a lot in different populations, for example, 9.7% in Malasia(MARZUKI *et al.*, 2008), 11.9% in Spain(FERNÁNDEZ-VILLAR *et al.*, 2004) and 3% in Canada(YEE *et al.*, 2003). After analysis of the clinical risk factors for hepatotoxicity it was observed that HIV and high baseline levels of transaminases are independent risk factors for

hepatotoxicity in our population. Other risk factors were observed in other populations, like female sex, old age and pre-existing liver diseases like hepatitis B and C (SAUKKONEN *et al.*, 2006; POSSUELO *et al.*, 2008), but in our study it was not observed. The recommendation to draw a study excluding patients with liver injuries, in order to have a clear understanding of the action of the anti-TB drugs in the liver, was unable at the present due to high number of affected patients.

In conclusion, our study indicates that *CYP2E1* wild type combined with NAT2 slow acetylator profile predispose an individual to anti-TB drug-induced hepatotoxicity. Further studies with larger cases of hepatotoxicity and simultaneous analysis of more polymorphisms should be carried in different ethnic populations and in different Brazilian regions.

Acknowledgments

The authors wish to thank trial participants for their consent and participation in the study, as well as the staff from Sanatorio Partenon Hospital for their assistance. This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Laboratório Exame, Novo Hamburgo, RS and PADCT/FEPPS. We declare that the experiments comply with the Brazilian current laws.

REFERENCES

1. Walker N, Kliner M, Turner D, et al. Hepatotoxicity and antituberculosis therapy: time to revise UK guidance? *Thorax*. Oct 2009;64(10):918.
2. Tostmann A, Boeree M, Aarnoutse R, de Lange W, van der Ven A, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol*. Feb 2008;23(2):192-202.
3. Conde M, Melo F, Marques A, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol*. Oct 2009;35(10):1018-1048.
4. Yew W, Leung C. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology*. Nov 2006;11(6):699-707.
5. Huang Y, Chern H, Su W, et al. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*. Apr 2003;37(4):924-930.

6. Leiro V, Fernández-Villar A, Valverde D, et al. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver Int.* Jul 2008;28(6):835-839.
7. Roy B, Chowdhury A, Kundu S, et al. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 'null' mutation. *J Gastroenterol Hepatol.* Sep 2001;16(9):1033-1037.
8. Possuelo L, Castelan J, de Brito T, et al. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur J Clin Pharmacol.* Jul 2008;64(7):673-681.
9. Saukkonen J, Cohn D, Jasmer R, et al. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* Oct 2006;174(8):935-952.
10. Fernández-Villar A, Sopena B, Fernández-Villar J, et al. The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis.* Dec 2004;8(12):1499-1505.
11. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans W. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57:119-137.
12. Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jan 2004;369(1):89-104.
13. Ingelman-Sundberg M, Sim S, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* Dec 2007;116(3):496-526.
14. Khan A, Ruwali M, Choudhuri G, Mathur N, Husain Q, Parmar D. Polymorphism in cytochrome P450 2E1 and interaction with other genetic risk factors and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Mutat Res.* May 2009;664(1-2):55-63.
15. Cho H, Koh W, Ryu Y, et al. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* Nov 2007;87(6):551-556.
16. Arif E, Vibhuti A, Alam P, et al. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta.* Jul 2007;382(1-2):37-42.
17. Liu R, Yin L, Pu Y. Association of combined CYP2E1 gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell carcinoma in Huai'an population, China. *Chin Med J (Engl).* Oct 2007;120(20):1797-1802.
18. Kato S, Shields P, Caporaso N, et al. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.* Dec 1992;52(23):6712-6715.
19. Boccia S, De Lauretis A, Gianfagna F, van Duijn C, Ricciardi G. CYP2E1PstI/RsaI polymorphism and interaction with tobacco, alcohol and GSTs in gastric cancer susceptibility: A meta-analysis of the literature. *Carcinogenesis.* Jan 2007;28(1):101-106.

20. Suarez-Kurtz G, Pena S. Pharmacogenomics in the Americas: the impact of genetic admixture. *Curr Drug Targets*. Dec 2006;7(12):1649-1658.
21. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. Feb 1988;16(3):1215.
22. Long J, Williams R, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet*. Mar 1995;56(3):799-810.
23. *MULTIPLE LOCUS HAPLOTYPE ANALYSIS* [computer program]. Version 2.0. Bethesda: Laboratory of Neurogenetics (NIAAA), National Institute of Health; 1999.
24. Watanabe J, Hayashi S, Kawajiri K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J Biochem*. Aug 1994;116(2):321-326.
25. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem*. Oct 1991;110(4):559-565.
26. Vuilleumier N, Rossier M, Chiappe A, et al. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur J Clin Pharmacol*. Jun 2006;62(6):423-429.
27. Roy P, Majumder M, Roy B. Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics*. Mar 2008;9(3):311-321.
28. Yue J, Peng R, Yang J, Kong R, Liu J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin*. May 2004;25(5):699-704.
29. Garte S, Gaspari L, Alexandrie A, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Dec 2001;10(12):1239-1248.
30. Ferreira P, Catarino R, Pereira D, et al. Cervical cancer and CYP2E1 polymorphisms: implications for molecular epidemiology. *Eur J Clin Pharmacol*. Jan 2006;62(1):15-21.
31. Ruwali M, Khan A, Shah P, Singh A, Pant M, Parmar D. Cytochrome P450 2E1 and head and neck cancer: interaction with genetic and environmental risk factors. *Environ Mol Mutagen*. Jul 2009;50(6):473-482.
32. Park G, Lee O, Kwon S, et al. Analysis of CYP2E1 polymorphism for the determination of genetic susceptibility to gastric cancer in Koreans. *J Gastroenterol Hepatol*. Nov 2003;18(11):1257-1263.
33. Ferreira P, Medeiros R, Vasconcelos A, et al. Association between CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev*. Jun 2003;12(3):205-211.
34. Bolt H, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab*. Aug 2006;7(6):613-628.

35. Hayes J, Flanagan J, Jowsey I. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.
36. Huang Y-S. Tailored drug therapy for mitigating drug-induced liver injury: is this the era of genetic screening? *Personalized Medicine*. 2010;7(1):5-8.
37. Hussain Z, Kar P, Husain S. Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. *Indian J Exp Biol*. Nov 2003;41(11):1226-1232.
38. Magno L, Talbot J, Talbot T, et al. Glutathione s-transferase variants in a Brazilian population. *Pharmacology*. 2009;83(4):231-236.
39. Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology*. 2004;27(2):133-138.
40. Kvitko K, Gaspar PdA, Torres M, Hutz M. CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology*. 2006;29(4):613-616.
41. Guerreiro-Junior V, Bisso-Machado R, Marrero A, Hünemeier T, Salzano F, Bortolini MC. Genetic Signatures of parental contribution in black and white populations in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2009;32(1):1-11.
42. Callegari-Jacques S, Grattapaglia D, Salzano F, et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol*. 2003 Nov-Dec 2003;15(6):824-834.
43. Marrero A, Bravi C, Stuart S, et al. Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. *Hum Hered*. 2007;64(3):160-171.
44. Marzuki O, Fauzi A, Ayoub S, Kamarul Imran M. Prevalence and risk factors of anti-tuberculosis drug-induced hepatitis in Malaysia. *Singapore Med J*. Sep 2008;49(9):688-693.
45. 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*. Jun 2003;167(11):1472-1477.

5. DISCUSSÃO FINAL

5.1. AVALIAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

No presente estudo, foi observada uma incidência de hepatotoxicidade de 6,1% entre os pacientes analisados. A incidência de casos de hepatotoxicidade e seus critérios clínicos em pacientes sob tratamento com RHZ ou esquema semelhante varia consideravelmente na literatura médica. A incidência de dano hepático induzido por fármacos antituberculose varia entre 1 e 47%, dependendo do regime utilizado e da definição de dano hepático (HUANG, 2007).

Num estudo retrospectivo, publicado por Vilarica e colaboradores, com 1400 pacientes tratados para tuberculose em Portugal, 12,5% desenvolveram reações adversas sendo que hepatotoxicidade foi a mais frequente (47,4%). Em 17,9% dos pacientes foi estabelecida uma associação definitiva entre o fármaco e a reação adversa, sendo que entre os 134 pacientes que tiveram caracterizada a gravidade da reação adversa, 6 faleceram, 5 devido à hepatotoxicidade e um por toxicidade renal (VILARIÇA *et al.*, 2010).

Com relação ao tempo para o desenvolvimento de hepatotoxicidade, 14 (93,3%) pacientes manifestaram o evento até o 17º dia de tratamento e um paciente apenas apresentou diagnóstico no 90º dia. Na revisão escrita por Huang, o período para o aparecimento da hepatotoxicidade varia de uma semana a 6 meses, sendo a média na 8ª semana. O autor ressalta a importância da realização de testes bioquímicos (ao menos o monitoramento da ALT e bilirrubinas) antes do início do tratamento e a cada 2 a 4 semanas nos primeiros meses (HUANG, 2007).

O grupo de pacientes que desenvolveu hepatotoxicidade possuía níveis de transaminases antes do início do tratamento significativamente mais elevado do que os sem hepatotoxicidade. Em média os valores de AST e ALT, nos pacientes com hepatotoxicidade, antes do início do tratamento, eram 41,9 U/L ($\pm 36,2$) e 40,5 U/L ($\pm 32,6$), enquanto nos demais os valores eram 26,5 U/L (± 16) e 28,6 ($\pm 19,1$), respectivamente. No estudo conduzido por TELEMAN e colaboradores (2002), foi encontrada associação entre altos níveis basais das enzimas hepáticas (transaminases e bilirrubina) e hepatotoxicidade (69 vs. 13 U/L, $p=0,001$). Outros fatores de risco encontrados nesse estudo foram sexo feminino e idade superior a 60 anos (TELEMAN *et al.*, 2002).

No presente estudo observou-se uma associação significativa entre hepatotoxicidade e infecção por HIV ($p=0.03$; RR= 3.5 (1.23-10.2)). A literatura relata que pacientes em tratamento para tuberculose, coinfectedados pelo HIV tem maior risco de sofrer efeitos adversos (UNGO *et al.*, 1998; BURMAN & JONES, 2001; YEE *et al.*, 2003; POSSUELO *et al.*, 2008; TOSTMANN *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2009). Em pacientes com coinfeção TB/HIV é recomendada prioridade ao tratamento da tuberculose e, quando indicada, a HAART deve ser iniciada de duas a quatro semana após o início do tratamento para tuberculose para evitar o desenvolvimento de reações adversas (CONDE *et al.*, 2009). Uma grande proporção dos pacientes já está em uso da HAART quando diagnosticados com tuberculose (BREEN *et al.*, 2006). Já foi estimado que os antiretrovirais reduzem entre 70% e 90% o risco de desenvolvimento da tuberculose, mesmo assim, a doença pode se desenvolver em qualquer momento após o início da terapia (HARRIES *et al.*, 2010). O uso da HAART concomitante ao tratamento da tuberculose é complicado por vários motivos, entre eles a interação medicamentosa e seu efeito tóxico adicional (BURMAN & JONES, 2001; CDC, 2007; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007). Os esquemas recomendados são os mesmos dos pacientes HIV negativos, com a possibilidade de substituição da RMP pela rifabutina em pacientes utilizando ARV incompatível com RMP (CONDE *et al.*, 2009). Neste estudo uso de HAART não apareceu como fator de risco para o desenvolvimento de hepatotoxicidade, mas observou-se um risco relativo de 3.13 (IC: 1.6-13.7).

O diagnóstico da infecção pelo HIV é realizado em cada paciente após sua primeira consulta no ambulatório de tuberculose. Os resultados são remetidos ao médico solicitante, e este informa o resultado ao paciente. Se confirmada a infecção pelo HIV, o paciente é encaminhado para o ambulatório específico (mais próximo de sua residência) para o acompanhamento e tratamento do HIV. Os testes de carga viral e contagem de CD4 são solicitados somente ao ingressar no programa para acompanhamento do HIV. A maioria dos pacientes que procuram o ambulatório de tuberculose já com diagnóstico positivo de HIV, está em acompanhamento em algum ambulatório ou hospital de Porto Alegre. Por estas razões não foram avaliados os resultados de carga viral e CD4 na população estudada (POSSUELO, 2008).

Quarenta (16,3%) pacientes apresentavam tuberculose extrapulmonar, seis (40%) dos 15 que desenvolveram hepatotoxicidade e 34 (14,8%) dos demais 230 pacientes. A

tuberculose extrapulmonar configurou fator de risco para hepatotoxicidade ($p=0,02$). Em um estudo do tipo caso-controle publicado por Singla e colaboradores (2010) observaram associação entre tuberculose extrapulmonar e hepatotoxicidade ($p<0,01$), descrevendo uma incidência de 55,4% de tuberculose extrapulmonar no grupo que desenvolveu hepatotoxicidade contra 33,6% no grupo controle (SINGLA *et al.*, 2010). No estudo feito na Malásia, por MARZUKI e colaboradores (2008), a infecção por HIV e a tuberculose extrapulmonar configuraram fatores de risco para hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose ($p=0,018$ e $p=0,017$, respectivamente) (MARZUKI *et al.*, 2008).

Outros fatores de risco clínicos encontram-se descritos na literatura incluindo idade avançada (PANDE *et al.*, 1996;SHARMA *et al.*, 2002;TELEMAN *et al.*, 2002;YEE *et al.*, 2003;SINGLA *et al.*, 2010), desnutrição (SINGLA *et al.*, 2010); alcoolismo (PANDE *et al.*, 1996), sexo feminino (DØSSING *et al.*, 1996;TELEMAN *et al.*, 2002) e hepatites B e/ou C (UNGO *et al.*, 1998;VILARIÇA *et al.*, 2010).

Dos 15 pacientes que desenvolveram hepatotoxicidade dois (13%) não tinham nenhum fator de risco para hepatotoxicidade, considerando os mais citados pela literatura (HIV, HCV, HBV, sexo feminino, idade avançada, alcoolismo). Considerando somente os fatores de risco associados neste estudo, (HIV, tuberculose extrapulmonar e AST/ALT iniciais elevados) 10 (66,6%) apresentavam fatores de risco, sendo dois casos de HIV somente, cinco HIV + TB extrapulmonar, um HIV + AST/ALT iniciais elevados, dois AST/ALT iniciais elevados somente e um HIV + TB extrapulmonar AST/ALT iniciais elevados. Apenas um paciente foi a óbito. Este não apresentava fatores de risco e levou 15 dias para desenvolver hepatotoxicidade. Este paciente fazia uso de digoxina e broncodilatador. Uma paciente (caso 15 da tabela 2 do artigo) de 27 anos, sem outros fatores de risco além do sexo feminino, que desenvolveu os sintomas clínicos de hepatotoxicidade com apenas cinco dias de medicação, sem extrapolar os níveis das enzimas. Esta paciente teve seu esquema terapêutico alterado para SHM e teve alta por cura sem desenvolver outro episódio de hepatotoxicidade. Ainda entre os pacientes com hepatotoxicidade, cinco (33,3%) faziam uso de outro(s) medicamentos: broncodilatador e digoxina (1), contraceptivo oral (2), insulina (1), paracetamol e amoxicilina (1), e hipoglicemiante (1). A frequência de RAMs foi levemente maior no grupo que fez uso de outros medicamentos (22%) comparado ao grupo que não fez uso (18%).

Com relação ao desfecho do tratamento para tuberculose, 194 (79,2%) dos pacientes obtiveram cura. Esse índice está abaixo da meta do Ministério da Saúde, no qual o índice desejável de cura é de 85% (HIJJAR *et al.*, 2007). Em um estudo conduzido por XU e colaboradores (2009), com abordagens quantitativas e qualitativas sobre adesão ao tratamento da tuberculose, 37,8% dos pacientes que abandonaram o tratamento apontaram as reações adversas aos fármacos como a principal razão para não adesão (XU *et al.*, 2009).

Os dados mostram a importância da vigilância clínica por parte dos profissionais da saúde responsáveis pelos pacientes com tuberculose. Os médicos devem acompanhar as funções hepáticas dos pacientes através de exames regulares, principalmente nos dois primeiros meses de tratamento, e em pacientes com doença hepática prévia ou com fatores de risco para hepatotoxicidade (YEW & LEUNG, 2006).

5.2. POLIMORFISMOS EM *CYP2E1*, *GSTM1* E *GSTT1*

Muitos trabalhos evidenciaram que os polimorfismos presentes nos genes que codificam as enzimas participantes da rota de metabolização da isoniazida estão associados à suscetibilidade à hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose (HUANG, 2007; ROY *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2008). Partindo da necessidade de aplicar esse conhecimento à realidade local, reforça-se, aqui, o principal objetivo traçado neste estudo: estimar a frequência de polimorfismos no genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* e sua relação com a incidência de efeitos adversos gastrointestinais, em especial hepatotoxicidade, em uma população em tratamento para tuberculose em Porto Alegre.

Analisando-se a região flanqueadora 5' de *CYP2E1*, observou-se que o genótipo mais frequentemente encontrado foi o selvagem *1A/*1A. A frequência para este genótipo foi 84,9% na posição -1293 (*Pst*I) e 85,7% na posição -1053 (*Rsa*I), enquanto que o genótipo homocigoto mutante *5B/*5B foi observado em 2% (-1293) e 1,6% (-1053). A frequência encontrada do genótipo homocigoto mutante foi próxima a descrita por Rossini e colaboradores para uma população do Rio de Janeiro (1%) (ROSSINI *et al.*, 2006). A frequência do genótipo *5B/*5B também figura semelhante aos brasileiros no trabalho de ROY *et al.* (2008) para europeus-americanos (1%) e GARTE *et al* para caucasianos (0,1%)

(GARTE *et al.*, 2001;ROY *et al.*, 2008). No trabalho desenvolvido por GASPAR e colaboradores com uma população eurodescendente de Porto Alegre, o genótipo homocigoto mutante não foi encontrado, porém o genótipo heterocigoto (*1A/*5B) estava presente em 3,3% dos pacientes (GASPAR *et al.*, 2004). O alelo *5B parece ser ainda mais raro em populações africanas e descendentes, como 0% de *5B e 98% de *1A, mostrado por Roy *et al.* (Roy2008). A maior presença do genótipo mutante *5B/*5B é sem dúvida em populações asiáticas, como foi demonstrado por FUKINO *et al.* (8,5% China), HUANG *et al.* (28%, China) e KATO *et al.* (27%, Japão) (KATO *et al.*, 1992;HUANG *et al.*, 2003;FUKINO *et al.*, 2008). A tabela 4 exibe a frequência alélica e genotípica para os polimorfismos na região a 5' de *CYP2E1* em diferentes populações.

Tabela 4: Tabela comparativa dos polimorfismos na região a 5' do promotor *CYP2E1*.

População	Freq. Alélica (%)		Freq. Genotípica (%)		
	*1A	*5	*1A/*1A	*1A/*5	*5/*5
Brasileiros (POA): -1053, RsaI*	92	8	85,7	12,7	1,6
Brasileiros (POA): -1293, PstI*	91,4	8,5	84,9	13,1	2
Euroamericanos (ROY <i>et al.</i> , 2008)	-	-	92	7	1
Afroamericanos (ROY <i>et al.</i> , 2008)	-	-	98	2	0
Taiwaneses (ROY <i>et al.</i> , 2008)	-	-	56	32	12
Eurobrasileiros (POA) (GASPAR <i>et al.</i> , 2004)	-	-	96,7	3,3	0
Caucasianos (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	-	-	92,4	7,5	0,1
Asiáticos (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	-	-	59,5	35,9	4,6
Japoneses (FUKINO <i>et al.</i> , 2008)	-	-	62	29,5	8,5
Brasileiros (Rio de Janeiro) (STEPHENS <i>et al.</i> , 1994)	92	8	91	8	1

POA: Porto Alegre; *Presente estudo.

Com relação à região do íntron 6 de *CYP2E1* o alelo mutante (*6) está presente numa frequência de 12%, e o alelo selvagem (*1A) 88%. Novamente esses números estão em similaridade com dos americanos descendentes de europeus descritos por ROY *et al.*, (10% para *6) (ROY *et al.*, 2008). As frequências genotípicas na população do presente estudo são: 78% *1A/*1A, 20% *1A/*6 e 2% *6/*6. Para essa região, a diferença com a população carioca estudada por ROSSINI e colaboradores (2006) aumenta, onde se observou 84,8% *1A/*1A, 14,5% *1A/*6 e 0,7% *6/*6 (ROSSINI *et al.*, 2006). Mais uma vez o alelo mutante mostra-se mais frequente na população asiática (0,25 em Taiwanese e 0,33 em Japoneses) como descrito no trabalho de ROY *et al.* (2008).

Tabela 5: Tabela comparativa dos polimorfismos no íntron 6 de *CYP2E1*.

População	Freq. Alélica (%)		Freq. Genotípica (%)		
	*1A	*6	*1A/*1A	*1A/*6	*6/*6
Brasileiros (POA) (Presente estudo)	88	12	78	20	2
Euroamericanos (Roy <i>et al.</i> , 2008)	90	10	-	-	-
Afroamericanos (Roy <i>et al.</i> , 2008)	100	-	-	-	-
Taiwaneses (Roy <i>et al.</i> , 2008)	75	25	-	-	-
Caucasianos (Garte <i>et al.</i> , 2001)	-	5,3	85,4	13,8	0,8
Asiáticos (Garte <i>et al.</i> , 2001)	-	6,3	48,3	42,3	9,4
Brasileiros (Rio de Janeiro) (Rossini <i>et al.</i> , 2006)	-	-	84,8	14,5	0,7
Japoneses (Fukino <i>et al.</i> , 2008)	-	-	49,6	40,3	10,1

POA: Porto Alegre.

Os primeiros trabalhos abordando os polimorfismos na região -1293 (*PstI*) e -1053 (*RsaI*) de *CYP2E1* relataram que estes estavam em completo desequilíbrio de ligação (WATANABE *et al.*, 1994). Esse fato gerou uma tendência, para os trabalhos que se seguiram, de analisar apenas um locus, não permitindo a avaliação do DL. O resultado foi a caracterização do haplótipo *1A como presença do alelo selvagem em -1053 e -1293 (presença de sítio de clivagem para *RsaI* e ausência de sítio de clivagem para *PstI*, respectivamente), e do haplótipo *5B como presença da mutação em -1053 e -1293 (ausência de sítio para *RsaI* e presença de sítio para *PstI*). Na população estudada por

KATO e colaboradores (1992), oito (3%) pacientes não apresentaram DL para essa região (KATO *et al.*, 1992), numa proporção semelhante à vista neste estudo, de cinco pacientes (2%).

Alguns autores relataram que mutações no gene *CYP2E1* resultariam numa atividade aumentada da enzima no fígado, acelerando o processo de lesão (HAYASHI *et al.*, 1991; WATANABE *et al.*, 1994). INOUE *et al.* (2000) expuseram que os polimorfismos *5B e *6 conferem atividade igual ao genótipo selvagem (INOUE *et al.*, 2000). Porém, a tendência atual persiste na ideia de que o genótipo selvagem para *CYP2E1* possui atividade plena da enzima, com maior formação de metabólitos tóxicos, propiciando danos hepáticos (SUN *et al.*, 2008). O fato de os polimorfismos em *CYP2E1* terem sido muitas vezes associados com alterações no metabolismo e com bioindicação de toxicidade sugere que esses polimorfismos possuem significado funcional importante *in vivo*. A influência destes polimorfismos nas reações adversas é específica ao substrato e ambiente, dependendo do papel de CYP na ativação *versus* detoxificação, e de diversos fatores que afetam a expressão gênica e a estabilidade da proteína (NEAFSEY *et al.*, 2009).

A superfamília gênica *GST* codifica enzimas de fase II, que catalisam a conjugação das glutationas em substratos eletrofílicos, inativando ou diminuindo o potencial tóxico do xenobiótico (BOLT & THIER, 2006; HUANG, 2007). Durante a metabolização da isoniazida, as enzimas *GSTM1* e *GSTT1* participam na detoxificação de metabólitos tóxicos produzidos pela *CYP2E1* na fase I. Apesar da sua grande importância, os genes que codificam estas enzimas estão deletados em uma expressiva parcela da população, exibindo distribuição étnica variável (BOLT & THIER, 2006).

No presente estudo, a frequência da deleção de *GSTM1* (42,9%) é similar às já descritas na literatura para a população brasileira: 48% e 44% em brasileiros de cor branca e intermediária do Rio de Janeiro (SUAREZ-KURTZ & PENA, 2006) e 50% em uma população eurobrasileira de Porto Alegre (GASPAR *et al.*, 2004).

Para *GSTT1* a deleção foi observada em 12,2% da população. A relação de similaridade com os dois estudos brasileiros recém citados não permanece para este gene. No estudo carioca, a frequência de *GSTT1* no grupo de cor branca foi 26% e 24% para o grupo de cor intermediária (SUAREZ-KURTZ & PENA, 2006) e no estudo de Porto Alegre, a frequência do polimorfismo foi vista em 21,1% da população (GASPAR *et al.*,

2004). Em alguns estudos, as frequências no polimorfismo para os dois genes exibem similaridade com este. Para GSTM1-nulo e GSTT1-nulo, BAILLET *et al.* (2007) encontraram em 39,8% e 16,4% de populações ameríndia do pampa argentino e paraguaio, ROY *et al.* (2008) descreveram frequências de 40-53% e 10-12% para hispânicos, e GARTE *et al.* (2001) 46,9% e 13% para finlandeses e 49% e 16% para italianos, respectivamente (GARTE *et al.*, 2001;BAILLIET *et al.*, 2007;ROY *et al.*, 2008). Comparando com outros trabalhos brasileiros, a baixa frequência da deleção de *GSTT1* na população aqui estudada surpreendeu e impulsionou a realizarmos nova genotipagem. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores habituais da literatura, a frequência de 12,2% foi confirmada. A tabela 6 exibe a frequência alélica e genotípica para os polimorfismos em diferentes populações.

Tabela 6: Tabela comparativa dos polimorfismos em *GSTM1* e *GSTT1*.

População	GSTM1 nulo (%)	GSTT1 nulo (%)
Brasileiros (POA) (Presente estudo)	42,9	12,2
Ameríndios Argentinos (BAILLIET <i>et al.</i> , 2007)	39,8	16,4
Afroamericanos (ROY <i>et al.</i> , 2008)	23-41	22-29
Euroamericanos (ROY <i>et al.</i> , 2008)	35-62	15-31
Chineses (ROY <i>et al.</i> , 2008)	35-63	58
Hispanícos (ROY <i>et al.</i> , 2008)	40-53	10-12
Indianos (ROY <i>et al.</i> , 2008)	20-79	3-39
Finlandeses (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	46,9	13
Alemães (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	51	19
Italianos (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	49	16
Suecos (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	55	13
Espanhóis (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	49	20
Japoneses (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	47	35
Coreanos (GARTE <i>et al.</i> , 2001)	52	51
Eurobrasileiros (POA) (GASPAR <i>et al.</i> , 2004)	50	21.1
Afrobrasileiros (POA) (KVITKO <i>et al.</i> , 2006)	34	28
Brasileiros brancos (ARRUDA <i>et al.</i> , 1998)	55	19
Brasileiros negros (ARRUDA <i>et al.</i> , 1998)	33	19
Brasileiros ameríndios (ARRUDA <i>et al.</i> , 1998)	20	11

POA: Porto Alegre.

5.3. POLIMORFISMOS E HEPATOTOXICIDADE

Neste estudo, não foi observada relação entre os polimorfismos em *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* e hepatotoxicidade. Foi possível fazer esta associação quando se analisou os polimorfismos em associação com o perfil acetilador lento para NAT2. A análise dos polimorfismos em NAT2 e a caracterização fenotípica nessa população foi feita por POSSUELO e colaboradores em 2008 (POSSUELO *et al.*, 2008). A combinação do

genótipo selvagem (*RsaI* *1A) na região flanqueadora 5' de *CYP2E1* com perfil acetilador lento está associada à hepatotoxicidade ($p=0,002$). Acrescentando o genótipo selvagem *PstI**1A à combinação anterior, a associação permanece ($p=0,017$) (tab.5). É importante salientar que o alelo polimórfico (*5) em *CYP2E1* é raro (0,08 *RsaI* e 0,085 *PstI*) e o genótipo selvagem é o mais frequentemente encontrado, inclusive na população que não desenvolveu reações adversas.

LEIRO e colaboradores (2008) estudaram as deleções de *GSTs* em uma população que fez tratamento para tuberculose na Espanha e constataram uma associação do polimorfismo em *GSTT1* e hepatotoxicidade (LEIRO *et al.*, 2008). Já ROY e colaboradores (2001) encontraram o genótipo homocigoto para *GSTM1*-nulo em associação com hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose (ROY *et al.*, 2001).

FUKINO e colaboradores (2008) estudaram a influência de polimorfismos em *NAT2*, *CYP2E1* e *GSTs* em relação às concentrações séricas de isoniazida e metabólitos em pacientes com tuberculose. Os autores apontaram o fenótipo acetilador lento para *NAT2* e o genótipo *GSTM1*-nulo como fatores de risco para o acúmulo de hidrazina, situação propícia para o desenvolvimento de doenças hepáticas (FUKINO *et al.*, 2008).

HUANG e colaboradores, em seus estudos, encontraram o perfil acetilador lento para *NAT2* e o genótipo *CYP2E1**1A/1A associados com hepatotoxicidade causada pelo regime antituberculose (HUANG *et al.*, 2002;HUANG *et al.*, 2003). CHO e colaboradores (2007) analisaram polimorfismos em *NAT* e *CYP2E1* e relataram associação entre hepatotoxicidade e perfil acetilador lento para *NAT2* (CHO *et al.*, 2007).

5.4. FARMACOGENÔMICA E DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES

A promessa da medicina personalizada foi a mola que impulsionou os estudos farmacogenômicos (MANCINELLI *et al.*, 2000). Ao longo dos anos muitos autores têm proposto testes farmacogenéticos antes do tratamento, apostando no seu potencial para mudar o método de prescrever e dosar medicamentos. Este é um dos primeiros passos em direção à medicina personalizada (SHEFFIELD & PHILLIMORE, 2009). Entretanto

DAAR & SINGER (2005) entendem que a aplicação da farmacogenética deve mudar o foco, partindo das diferenças individuais para as diferenças interpopulacionais. Os autores compartilham a idéia de que conhecendo os genótipos de populações locais, dentro das populações miscigenadas dos países em desenvolvimento, é possível presumir a resposta ao fármaco sem a necessidade de testes individuais. Essa aplicação seria economicamente favorável e importante para a correta prescrição, antes do advento da medicina personalizada. O impacto da farmacogenética na saúde global tem sido abordado, especialmente para doenças infecciosas negligenciadas como malária, tuberculose e HIV/AIDS (PANG, 2003; DAAR & SINGER, 2005).

O Brasil é uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de misturas entre Ameríndios autóctones, Europeus brancos e Africanos do sub-Saara. Essa heterogeneidade é uma característica decisiva para a elaboração e interpretação de estudos clínicos, para a implementação dos conhecimentos da farmacogenômica na prescrição de medicamentos, e para o adequação de dados obtidos de populações mais homogêneas para a realidade brasileira (SUAREZ-KURTZ, 2009).

O conhecimento do perfil genético de um paciente poderia garantir o sucesso do tratamento e evitar reações adversas. Todavia, conhecer o perfil genético da população já seria de grande valia e muito mais adequado à realidade da saúde pública no Brasil, sobretudo em se tratando de uma doença infecciosa, negligenciada e de alta incidência, como a tuberculose.

A cidade de Porto Alegre tem uma composição étnica especial, abrigando descendentes de ameríndios Guarani, açorianos, portugueses, italianos, alemães, espanhóis, poloneses, judeus, libaneses e africanos (GUERREIRO-JUNIOR *et al.*, 2009; PORTO ALEGRE, 2010). Essa diversidade na constituição da Capital ajuda a explicar as diferenças genéticas observadas em outras regiões do País, e reforça a importância de caracterizar cada população em estudos genéticos.

6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados nesse trabalho mostram as frequências de polimorfismos em *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT* em uma população do Rio Grande do Sul. O estudo indica o perfil genético da população para os genes citados e aponta as variáveis HIV positivo, tuberculose extrapulmonar e níveis de transaminases basais alteradas como fatores de risco para o desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida pelo uso combinado dos fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida. O baixo número de pacientes com hepatotoxicidade foi um fator limitante neste estudo, tornando-se importante que outros estudos sejam realizados com um maior número de pacientes acometidos para confirmar os resultados.

Apesar de muitos fatores não genéticos influenciarem a na eficácia do tratamento e no desenvolvimento de reações adversas, os estudos farmacogenômicos têm elucidado a contribuição genética. A variação do genoma humano passou a ser um importante fator a ser analisado em casos de hepatotoxicidade por fármacos antituberculose. São necessários estudos com maior número de participantes e específicos para cada região geográfica ou grupo étnico, o que possibilitaria traçar o perfil genético de cada população e definir o tratamento adequado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIF, E.; VIBHUTI, A.; ALAM, P.; DEEPAK, D.; SINGH, B.; ATHAR, M. & PASHA, M. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinica Chimica Acta*, v.382, n.1-2, p.37-42. 2007.
- ARRUDA, V.; GRIGNOLLI, C.; GONCALVES, M.; SOARES, M.; MENEZES, R.; SAAD, S. & COSTA, F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clinical Genetics*, v.54, n.3, p.210–214. 1998.
- BAILLIET, G.; SANTOS, M. R.; ALFARO, E. L.; DIPIERRI, J. E.; DEMARCHI, D. A.; CARNESE, F. R. & BIANCHI, N. O. Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. *Mutation Research*, v.627, n.2, p.171-177. 2007.
- BÉNICHOU, C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *Journal of Hepatology*, v.11, n.2, p.272-276. 1990.
- BOCCIA, S.; DE LAURETIS, A.; GIANFAGNA, F.; VAN DUIJN, C. & RICCIARDI, G. CYP2E1PstI/RsaI polymorphism and interaction with tobacco, alcohol and GSTs in gastric cancer susceptibility: A meta-analysis of the literature. *Carcinogenesis*, v.28, n.1, p.101-106. 2007.
- BOLT, H. & THIER, R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Current Drug Metabolism*, v.7, n.6, p.613-628. 2006.
- BOZINA, N.; BRADAMANTE, V. & LOVRIC, M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, v.60, n.2, p.217-242. 2009.
- BREEN, R.; SWADEN, L.; BALLINGER, J. & LIPMAN, M. Tuberculosis and HIV co-infection: a practical therapeutic approach. *Drugs*, v.66, n.18, p.2299-2308. 2006.
- BRVAR, M.; FOKTER, N.; BUNC, M. & MOZINA, M. The frequency of adverse drug reaction related admissions according to method of detection, admission urgency and medical department specialty. *BMC Clinical Pharmacology*, v.9, p.8. 2009.
- BURMAN, W. & JONES, B. Treatment of HIV-related tuberculosis in the era of effective antiretroviral therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.164, n.1, p.7-12. 2001.
- CALLEGARI-JACQUES, S.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F.; SALAMONI, S.; CROSSETTI, S.; FERREIRA, M. & HUTZ, M. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *The American Journal of Human Biology*, v.15, n.6, p.824-834. 2003.

CASTELO FILHO, A.; KRITSKI, A.; BARRETO, A.; LEMOS, A.; RUFFINO-NETTO, A. & GUIMARÃES, C. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.30, n.1, p.57-86. 2004.

CDC. Managing Drug Interactions in the Treatment of HIV-Related Tuberculosis. http://www.cdc.gov/tb/TB_HIV_Drugs/default.htm.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Managing Drug Interactions in the Treatment of HIV-Related Tuberculosis. Managing Drug Interactions in the Treatment of HIV-Related Tuberculosis. Atlanta 15 de setembro de 2010

CHO, H.; KOH, W.; RYU, Y.; KI, C.; NAM, M.; KIM, J. & LEE, S. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh)*, v.87, n.6, p.551-556. 2007.

CONDE, M.; MELO, F.; MARQUES, A.; CARDOSO, N.; PINHEIRO, V.; DALCIN, P. T.; MACHADO JUNIOR, A.; LEMOS, A.; NETTO, A.; DUROVNI, B.; SANT'ANNA, C.; LIMA, D.; CAPONE, D.; BARREIRA, D.; MATOS, E.; MELLO, F.; DAVID, F.; MARSICO, G.; AFIUNE, J.; SILVA, J.; JAMAL, L.; TELLES, M.; HIRATA, M.; DALCOLMO, M.; RABAHI, M.; CAILLEAUX-CESAR, M.; PALACI, M.; MORRONE, N.; GUERRA, R.; DIETZE, R.; MIRANDA, S.; CAVALCANTE, S.; NOGUEIRA, S.; NONATO, T.; MARTIRE, T.; GALESI, V.; DETTONI, V. V.; TUBERCULOSIS, B. C. O. & GROUP, B. G. O. T. W. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.35, n.10, p.1018-1048. 2009.

CYP2E1. CYP2E1 allele nomenclature. CYP2E1 allele nomenclature.

DAAR, A. S. & SINGER, P. A. Pharmacogenetics and geographical ancestry: implications for drug development and global health. *Nature Reviews Genetics*, v.6, n.3, p.241-246. 2005.

DALY, A. Drug-induced liver injury: past, present and future. *Pharmacogenomics*, v.11, n.5, p.607-611. 2010.

DANIEL, T. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, v.100, n.11, p.1862-1870. 2006.

DØSSING, M.; WILCKE, J.; ASKGAARD, D. & NYBO, B. Liver injury during antituberculosis treatment: an 11-year study. *Tuber Lung Dis*, v.77, n.4, p.335-340. 1996.

DUCATI, R.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. & SANTOS, D. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, n.7, p.697-714. 2006.

EICHELBAUM, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M. & EVANS, W. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*, v.57, p.119-137. 2006.

FERNÁNDEZ-VILLAR, A.; SOPEÑA, B.; FERNÁNDEZ-VILLAR, J.; VÁZQUEZ-GALLARDO, R.; ULLOA, F.; LEIRO, V.; MOSTEIRO, M. & PIÑEIRO, L. The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.8, n.12, p.1499-1505. 2004.

FERREIRA, P.; CATARINO, R.; PEREIRA, D.; MATOS, A.; PINTO, D.; COELHO, A.; LOPES, C. & MEDEIROS, R. Cervical cancer and CYP2E1 polymorphisms: implications for molecular epidemiology. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.62, n.1, p.15-21. 2006.

FERREIRA, P.; MEDEIROS, R.; VASCONCELOS, A.; COSTA, S.; PINTO, D.; MORAIS, A.; OLIVEIRA, J. & LOPES, C. Association between CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, v.12, n.3, p.205-211. 2003.

FUKINO, K.; SASAKI, Y.; HIRAI, S.; NAKAMURA, T.; HASHIMOTO, M.; YAMAGISHI, F. & UENO, K. Effects of N-acetyltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 and Glutathione-S-transferase (GST) genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients. *The Journal of Toxicological Sciences*, v.33, n.2, p.187-195. 2008.

GARTE, S.; GASPARI, L.; ALEXANDRIE, A.; AMBROSONE, C.; AUTRUP, H.; AUTRUP, J.; BARANOVA, H.; BATHUM, L.; BENHAMOU, S.; BOFFETTA, P.; BOUCHARDY, C.; BRESKVAR, K.; BROCKMOLLER, J.; CASCORBI, I.; CLAPPER, M.; COUTELLE, C.; DALY, A.; DELL'OMO, M.; DOLZAN, V.; DRESLER, C.; FRYER, A.; HAUGEN, A.; HEIN, D.; HILDESHEIM, A.; HIRVONEN, A.; HSIEH, L.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; KALINA, I.; KANG, D.; KIHARA, M.; KIYOHARA, C.; KREMERS, P.; LAZARUS, P.; LE MARCHAND, L.; LECHNER, M.; VAN LIESHOUT, E.; LONDON, S.; MANNI, J.; MAUGARD, C.; MORITA, S.; NAZAR-STEWART, V.; NODA, K.; ODA, Y.; PARL, F.; PASTORELLI, R.; PERSSON, I.; PETERS, W.; RANNUG, A.; REBBECK, T.; RISCH, A.; ROELANDT, L.; ROMKES, M.; RYBERG, D.; SALAGOVIC, J.; SCHOKET, B.; SEIDEGARD, J.; SHIELDS, P.; SIM, E.; SINNET, D.; STRANGE, R.; STÜCKER, I.; SUGIMURA, H.; TO-FIGUERAS, J.; VINEIS, P.; YU, M. & TAIOLI, E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v.10, n.12, p.1239-1248. 2001.

GASPAR, P.; MOREIRA, J.; KVITKO, K.; TORRES, M.; MOREIRA, A. & WEIMER, T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology*, v.27, n.2, p.133-138. 2004.

GUERREIRO-JUNIOR, V.; BISSO-MACHADO, R.; MARRERO, A.; HÜNEMEIER, T.; SALZANO, F. & BORTOLINI, M. C. Genetic Signatures of parental contribution in black and white populations in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v.32, n.1, p.1-11. 2009.

GUZEY, C. & SPIGSET, O. Genotyping as a tool to predict adverse drug reactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.4, n.13, p.1411-1421. 2004.

HARRIES, A.; ZACHARIAH, R.; CORBETT, E.; LAWN, S.; SANTOS-FILHO, E.; CHIMZIZI, R.; HARRINGTON, M.; MAHER, D.; WILLIAMS, B. & DE COCK, K. The HIV-associated tuberculosis epidemic--when will we act? *The Lancet*, v.375, n.9729, p.1906-1919. 2010.

HAYASHI, S.; WATANABE, J. & KAWAJIRI, K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIIE1 gene. *The Journal of Biochemistry*, v.110, n.4, p.559-565. 1991.

HAYES, J.; FLANAGAN, J. & JOWSEY, I. Glutathione transferases. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.45, p.51-88. 2005.

HIJJAR, M.; GERHARDT, G.; TEIXEIRA, G. & PROCÓPIO, M. [Retrospect of tuberculosis control in Brazil]. *Revista de Saúde Pública*, v.41 Suppl 1, p.50-58. 2007.

HUANG, Y.-S. Tailored drug therapy for mitigating drug-induced liver injury: is this the era of genetic screening? *Personalized Medicine*, v.7, n.1, p.5-8. 2010.

HUANG, Y. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v.3, n.1, p.1-8. 2007.

HUANG, Y.; CHERN, H.; SU, W.; 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, n.4, p.924-930. 2003.

HUANG, Y. S.; CHERN, H. D.; SU, W. J.; WU, J. C.; LAI, S. L.; YANG, S. Y.; CHANG, F. Y. & LEE, S. D. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*, v.35, n.4, p.883-889. 2002.

HUSSAIN, Z.; KAR, P. & HUSAIN, S. Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.41, n.11, p.1226-1232. 2003.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.369, n.1, p.89-104. 2004.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; SIM, S.; GOMEZ, A. & RODRIGUEZ-ANTONA, C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, v.116, n.3, p.496-526. 2007.

INOUE, K.; YAMAZAKI, H. & SHIMADA, T. Characterization of liver microsomal 7-ethoxycoumarin O-deethylation and chlorzoxazone 6-hydroxylation activities in Japanese

and Caucasian subjects genotyped for CYP2E1 gene. *Archives of Toxicology*, v.74, n.7, p.372-378. 2000.

JC, L. MULTIPLE LOCUS HAPLOTYPE ANALYSIS. Bethesda: Laboratory of Neurogenetics (NIAAA), National Institute of Health 1999.

KATO, S.; SHIELDS, P.; CAPORASO, N.; HOOVER, R.; TRUMP, B.; SUGIMURA, H.; WESTON, A. & HARRIS, C. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Research*, v.52, n.23, p.6712-6715. 1992.

KHAN, A.; RUWALI, M.; CHOUDHURI, G.; MATHUR, N.; HUSAIN, Q. & PARMAR, D. Polymorphism in cytochrome P450 2E1 and interaction with other genetic risk factors and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Mutation Research*, v.664, n.1-2, p.55-63. 2009.

KHEDHAIER, A.; HASSEN, E.; BOUAOUINA, N.; GABBOUJ, S.; AHMED, S. & CHOUCANE, L. Implication of Xenobiotic Metabolizing Enzyme gene (CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, mEH and NAT2) polymorphisms in breast carcinoma. *BMC Cancer*, v.8, p.109. 2008.

KRITSKI, A.; VILLA, T.; TRAJMAN, A.; LAPA E SILVA, J.; MEDRONHO, R. & RUFFINO-NETTO, A. [Two decades of research on tuberculosis in Brazil: state of the art of scientific publications]. *Revista de Saúde Pública*, v.41 Suppl 1, p.9-14. 2007.

KVITKO, K.; GASPAR, P. D. A.; TORRES, M. & HUTZ, M. *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, n.4, p.613-616. 2006.

LEIRO, V.; FERNÁNDEZ-VILLAR, A.; VALVERDE, D.; CONSTENLA, L.; VÁZQUEZ, R.; PIÑEIRO, L. & GONZÁLEZ-QUINTELA, A. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver International*, v.28, n.6, p.835-839. 2008.

LIU, R.; YIN, L. & PU, Y. Association of combined CYP2E1 gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell carcinoma in Huai'an population, China. *Chinese Medical Journal (English Edition)*, v.120, n.20, p.1797-1802. 2007.

LONG, J.; WILLIAMS, R. & URBANEK, M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *American Journal of Human Genetics*, v.56, n.3, p.799-810. 1995.

LÖNNROTH, K.; CASTRO, K.; CHAKAYA, J.; CHAUHAN, L.; FLOYD, K.; GLAZIOU, P. & RAVIGLIONE, M. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. *The Lancet*, v.375, n.9728, p.1814-1829. 2010.

MACIEL, E.; GUIDONI, L.; FAVERO, J.; HADAD, D.; MOLINO, L.; JONHSON, J. & DIETZE, R. [Adverse effects of the new tuberculosis treatment regimen recommended by

the Brazilian Ministry of Health]. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.36, n.2, p.232-238. 2010.

MAGNO, L.; TALBOT, J.; TALBOT, T.; BORGES SANTOS, A.; SOUZA, R.; MARIN, L.; MORELI, M.; DE MELO, P.; CORRÊA, R.; RIOS SANTOS, F. & DI PIETRO, G. Glutathione s-transferase variants in a brazilian population. *Pharmacology*, v.83, n.4, p.231-236. 2009.

MANCINELLI, L.; CRONIN, M. & SADEE, W. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, v.2, n.1, p.E4. 2000.

MARRERO, A.; BRAVI, C.; STUART, S.; LONG, J.; PEREIRA DAS NEVES LEITE, F.; KOMMERS, T.; CARVALHO, C.; PENA, S.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, F. & CÁTIRA BORTOLINI, M. Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. *Human Heredity*, v.64, n.3, p.160-171. 2007.

MARZUKI, O.; FAUZI, A.; AYOUB, S. & KAMARUL IMRAN, M. Prevalence and risk factors of anti-tuberculosis drug-induced hepatitis in Malaysia. *Singapore Medical Journal*, v.49, n.9, p.688-693. 2008.

MILLER, S.; DYKES, D. & POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v.16, n.3, p.1215. 1988.

MITNICK, C.; MCGEE, B. & PELOQUIN, C. Tuberculosis pharmacotherapy: strategies to optimize patient care. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v.10, n.3, p.381-401. 2009.

NEAFSEY, P.; GINSBERG, G.; HATTIS, D.; JOHNS, D.; GUYTON, K. & SONAWANE, B. Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, v.12, n.5-6, p.362-388. 2009.

NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS. *Pharmacogenetics - Ethical Issues*, v. London.2003

O'SHEA, D.; KIM, R. B. & WILKINSON, G. R. Modulation of CYP2E1 activity by isoniazid in rapid and slow N-acetylators. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.43, n.1, p.99-103. 1997.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C. & RITACCO, V. *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care.*, v.2007

PANDE, J.; SINGH, S.; KHILNANI, G.; KHILNANI, S. & TANDON, R. Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. *Thorax*, v.51, n.2, p.132-136. 1996.

PANG, T. Impact of pharmacogenomics on neglected diseases of the developing world. *American Journal of Pharmacogenomics*, v.3, n.6, p.393-398. 2003.

PARK, G.; LEE, O.; KWON, S.; LEE, C.; YOON, B.; HAHM, J.; LEE, M.; HOO LEE, D.; KEE, C. & SUN, H. Analysis of CYP2E1 polymorphism for the determination of genetic susceptibility to gastric cancer in Koreans. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.18, n.11, p.1257-1263. 2003.

PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; HAKKOLA, J.; HONKAKOSKI, P.; HUKKANEN, J. & RAUNIO, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, v.82, n.10, p.667-715. 2008.

PIAO, Y. F.; LI, J. T. & SHI, Y. Relationship between genetic polymorphism of cytochrome P450IIE1 and fatty liver. *World Journal of Gastroenterology*, v.9, n.11, p.2612-2615. 2003.

PIRMOHAMED, M.; JAMES, S.; MEAKIN, S.; GREEN, C.; SCOTT, A. K.; WALLEY, T. J.; FARRAR, K.; PARK, B. K. & BRECKENRIDGE, A. M. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *British Medical Journal*, v.329, n.7456, p.15-19. 2004.

PORTO ALEGRE. Origens. Origens. Secretaria de Turismo.http://www2.portoalegre.rs.gov.br/turismo/default.php?p_secao=257.

POSSUELO, L. Estudo de polimorfismos presentes no gene que codifica N-acetiltransferase 2 e associação com hepatotoxicidade em pacientes com tuberculose tratados com RHZ. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

POSSUELO, L.; CASTELAN, J.; DE BRITO, T.; RIBEIRO, A.; CAFRUNE, P.; PICON, P.; SANTOS, A.; TEIXEIRA, R.; GREGIANINI, T.; HUTZ, M.; ROSSETTI, M. & ZAHA, A. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.64, n.7, p.673-681. 2008.

RISSATO, M. D. A. R.; ROMANO-LIEBER, N. S. & LIEBER, R. R. Terminologia de incidentes com medicamentos no contexto hospitalar. *Caderno de Saúde Pública*, v.24, n.9, p.1965-1975. 2008.

ROSSINI, A.; LIMA, S.; RAPOZO, D.; FARIA, M.; ALBANO, R. & PINTO, L. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, n.2, p.195-201. 2006.

ROUGHEAD, E. & SEMPLE, S. Medication safety in acute care in Australia: where are we now? Part 1: a review of the extent and causes of medication problems 2002-2008. *Australia and New Zealand Health Policy*, v.6, p.18. 2009.

ROY, B.; CHOWDHURY, A.; KUNDU, S.; SANTRA, A.; DEY, B.; CHAKRABORTY, M. & MAJUMDER, P. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in

individuals with glutathione S-transferase M1 'null' mutation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.16, n.9, p.1033-1037. 2001.

ROY, P.; MAJUMDER, M. & ROY, B. Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics*, v.9, n.3, p.311-321. 2008.

RUWALI, M.; KHAN, A.; SHAH, P.; SINGH, A.; PANT, M. & PARMAR, D. Cytochrome P450 2E1 and head and neck cancer: interaction with genetic and environmental risk factors. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.50, n.6, p.473-482. 2009.

SAÚDE, S. D. V. E. Casos novos de tuberculose caem 2,3% ao ano, diz PNC. SVS em rede.

SAUKKONEN, J.; COHN, D.; JASMER, R.; SCHENKER, S.; JEREB, J.; NOLAN, C.; PELOQUIN, C.; GORDIN, F.; NUNES, D.; STRADER, D.; BERNARDO, J.; VENKATARAMANAN, R.; STERLING, T. & SUBCOMMITTEE, A. A. T. S. H. O. A. T. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.174, n.8, p.935-952. 2006.

SCHLUGER, N. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v.32, n.4, p.251-256. 2005.

SHARMA, S.; BALAMURUGAN, A.; SAHA, P.; PANDEY, R. & MEHRA, N. Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.166, n.7, p.916-919. 2002.

SHEFFIELD, L. J. & PHILLIMORE, H. E. Clinical use of pharmacogenomic tests in 2009. *The Clinical Biochemist Reviews*, v.30, n.2, p.55-65. 2009.

SINAN. Dados e Indicadores. Epidemiologia da Tuberculose no Brasil. Dados e Indicadores. Epidemiologia da Tuberculose no Brasil. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31116. Visualizado em 23/09/2010.

SINGLA, R.; SHARMA, S.; MOHAN, A.; MAKHARIA, G.; SREENIVAS, V.; JHA, B.; KUMAR, S.; SARDA, P. & SINGH, S. Evaluation of risk factors for antituberculosis treatment induced hepatotoxicity. *The Indian Journal of Medical Research*, v.132, p.81-86. 2010.

STEPHENS, E. A.; TAYLOR, J. A.; KAPLAN, N.; YANG, C. H.; HSIEH, L. L.; LUCIER, G. W. & BELL, D. A. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics*, v.4, n.4, p.185-192. 1994.

SUAREZ-KURTZ, G. The implications of population admixture in race-based drug prescription. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v.83, n.3, p.399-400; author reply 400. 2008.

SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenomics and the genetic diversity of the Brazilian population. *Cadernos de Saude Publica*, v.25, n.8, p.1650-1651. 2009.

SUAREZ-KURTZ, G. & PENA, S. Pharmacogenomics in the Americas: the impact of genetic admixture. *Current Drug Targets*, v.7, n.12, p.1649-1658. 2006.

SUN, F.; CHEN, Y.; XIANG, Y. & ZHAN, S. Drug-metabolising enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.12, n.9, p.994-1002. 2008.

SVS, S. D. V. E. S. Informe eletrônico da tuberculose. Boletim eletrônico epidemiológico.

TELEMAN, M.; CHEE, C.; EARNEST, A. & WANG, Y. Hepatotoxicity of tuberculosis chemotherapy under general programme conditions in Singapore. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.6, n.8, p.699-705. 2002.

TOSTMANN, A.; BOEREE, M.; AARNOUTSE, R.; DE LANGE, W.; VAN DER VEN, A. & DEKHUIJZEN, R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.23, n.2, p.192-202. 2008.

UMENO, M.; MCBRIDE, O. W.; YANG, C. S.; GELBOIN, H. V. & GONZALEZ, F. J. Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry*, v.27, n.25, p.9006-9013. 1988.

UNGO, J.; JONES, D.; ASHKIN, D.; HOLLENDER, E.; BERNSTEIN, D.; ALBANESE, A. & PITCHENIK, A. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. The role of hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.157, n.6 Pt 1, p.1871-1876. 1998.

VILARIÇA, A.; DIOGO, N.; ANDRÉ, M. & PINA, J. Adverse reactions to antituberculosis drugs in in-hospital patients: Severity and risk factors. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v.16, n.3, p.431-451. 2010.

VUILLEUMIER, N.; ROSSIER, M.; CHIAPPE, A.; DEGOUMOIS, F.; DAYER, P.; MERMILLOD, B.; NICOD, L.; DESMEULES, J. & HOCHSTRASSER, D. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.62, n.6, p.423-429. 2006.

WALKER, N.; KLINER, M.; TURNER, D.; BHAGANI, S.; CROPLEY, I.; HOPKINS, S. & LIPMAN, M. Hepatotoxicity and antituberculosis therapy: time to revise UK guidance? *Thorax*, v.64, n.10, p.918. 2009.

WATANABE, J.; HAYASHI, S. & KAWAJIRI, K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *The Journal of Biochemistry*, v.116, n.2, p.321-326. 1994.

WEINSHILBOUM, R. Inheritance and drug response. *New England Journal of Medicine*, v.348, n.6, p.529-537. 2003.

WEISINGER, R. A. Isoniazid Hepatotoxicity. *eMedicine Gastroenterology* 2007.

WESTER, K.; JONSSON, A. K.; SPIGSET, O.; DRUID, H. & HAGG, S. Incidence of fatal adverse drug reactions: a population based study. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.65, n.4, p.573-579. 2008.

WHITE, D.; LI, D.; NURGALIEVA, Z. & EL-SERAG, H. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, v.167, n.4, p.377-389. 2008.

WHO. Tuberculosis. *Fact sheet N°104*. 2010.

WJST, M. & WERNER, M. Methods of Genotyping. In: Hall, I. P. & Pirmohamed, M. (Ed.). *Pharmacogenetics*. New York: Informa Health Care, *Methods of Genotyping*, p.324-2006.

XU, W.; LU, W.; ZHOU, Y.; ZHU, L.; SHEN, H. & WANG, J. Adherence to anti-tuberculosis treatment among pulmonary tuberculosis patients: a qualitative and quantitative study. *BMC Health Services Research*, v.9, p.169. 2009.

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. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.167, n.11, p.1472-1477. 2003.

YEW, W. & LEUNG, C. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology*, v.11, n.6, p.699-707. 2006.

YUE, J.; PENG, R.; YANG, J.; KONG, R. & LIU, J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.25, n.5, p.699-704. 2004.

ZHOU, G.; HU, J. & LI, Q. CYP2E1 PstI/RsaI polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, v.16, n.23, p.2949-2953. 2010.

ZIENOLDDINY, S.; CAMPA, D.; LIND, H.; RYBERG, D.; SKAUG, V.; STANGELAND, L.; CANZIAN, F. & HAUGEN, A. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of non-small cell lung cancer in smokers. *Carcinogenesis*, v.29, n.6, p.1164-1169. 2008.

8. APÊNDICES

8.1 APÊNDICE 1: Questionário submetido ao paciente pelo grupo de pesquisa para obtenção de dados clínicos e epidemiológicos.

QUESTINÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Prontuário N°: _____ Quest N°: _____

Data da entrevista: _____ Médico: _____

Questionário Epidemiológico

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

1. Origem: (1) hospital (2) ambulatório

2. Nome: _____

3. Endereço: _____

4. Bairro: _____

5. Cidade: (1)POA (2) Outra: _____ Telefone de contato: _____

6. Renda familiar: (1) Sem renda (2) R\$ _____

7. Estado civil: (1) Acompanhado (2) Não acompanhado (99) IGN

8. Escolaridade: () Analfabetismo () _____ série do _____ grau (99) IGN

9. Data de Nascimento: ___/___/___ Número de pessoas da casa: _____

10. Gênero: (1) masculino (2) feminino

11. Cor da Pele (corpele): (1) branca (2) mulata clara (3) mulata média (4) mulata escura (5) negra (6) amarela (7) parda (8) outra: _____ (99) IGN

12. Profissão: _____ (99) IGN

* se aposentado perguntar sobre a rotina _____

13. Cicatriz vacinal (BCG): (1)sim (2)não (99) IGN

14. Tosse: (1) Sim (2) Não (99) IGN Quanto tempo? _____
15. Escarro: (1) Sim (2) Não (99) IGN Quanto tempo? _____
16. Tabagismo: (1) Sim (2) Não (99) IGN
 Cigarros/dia: _____ () IGN
 Ex-tabagista: (1) Sim (2) Não (99) IGN
 Cigarros/dia: _____ () IGN
17. Usuário de drogas: (1) Sim (2) Não (99) IGN Qual? _____
18. Hepatopatias (hepat):
 - hepatite B (1) sim (2) não (99) IGN
 - hepatite C (1) sim (2) não (99) IGN
 - cirrose (1) sim (2) não (99) IGN
19. Uso de Corticóide ou imunossuppressores: (1) Sim (2) Não (99) IGN
 (>15mg de prednisona, >30 dias consecutivos ou drogas citotóxicas)
20. Uso de anticoncepcional oral (aco): (1) sim (2) não (99) IGN
21. Diabetes Mellitus (dm): (1) sim (2) não (99) IGN
 - uso de insulina? (1) sim (2) não (99) IGN
22. Neoplasia maligna (nm): (1) sim (2) não (99) IGN
23. Insuficiência renal: (1) sim (2) não (99) IGN
24. Desnutrição (IMC<20): (1) Sim (2) Não (99) IGN
 Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____
25. Gravidez: (1) sim (2) não (99) IGN
26. Presidiário: (1) sim (2) não (99) IGN
27. Alcoolismo (critérios CAGE): (1) sim (2) não (99) IGN
 A) Qual o tipo de bebida o Sr(a) prefere?
 () cachaça () cerveja () vinho () whisky () outro () nenhum

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

- B) O Sr(a) tem facilidade de fazer amizades? (1) sim (2) não
- C) Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida? : (1) sim (2) não

D) Alguém critica ou já criticou seu modo de beber? : (1)sim (2)não

E) Costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca? : (1)sim (2)não

F) Sente-se culpado pela maneira que costuma beber? : (1)sim (2)não

Caso a resposta tenha sido sim para pelo menos 02 questões (c, d, e ou f), assinale alcoolismo como positivo.

28. Tuberculose anterior (tbpass): (1) sim (2) não (99) IGN
Tipo: (1) Pulmonar (2) Extrapulmonar (3) Ambos (99) IGN
Número de episódios: _____ (99) IGN
Ano do último episódio: _____ (99) IGN
Desfecho do último episódio: (1) Cura (2) Abandono (3) Falência (99) IGN
29. Contato com paciente com tuberculose: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Relação com o contato: _____
Época do contato: _____
30. Quimioprofilaxia: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Desfecho: (1) Término (2) Abandono (99) IGN
31. Internação hospitalar nos últimos 2 anos: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Local: _____ Motivo: _____
32. HIV: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado (99) IGN
33. Uso de anti-retroviral (usoarv): (1)sim (2)não (99)IGN
Onde realiza o tratamento? _____
34. Anti-retroviral em uso: _____
35. Câncer familiar: (1)sim (2)não (3)ignorado (99) IGN
36. Tipo de câncer familiar: (1) intestino (2) esôfago (3) baço (4) útero (5) fígado (6) mama (7) pulmão (8) leucemia (9) pâncreas (10) estômago (11) próstata (12) ossos (13) leucemia (14) generalizado (15) bexiga (99) IGN
outro _____
37. Tipo de TB atual: (1) pulmonar (2) extrapulmonar
38. Tipo de TB extrapulmonar: _____

39. Medicamentos para TB atual: (1)RHZ (2)outro_____ (3) H

40. Outros medicamentos: _____

Análise de prontuário

Resultados dos exames realizados

40. PPD: (1) sim (2) não (3) ignorado (4) Não realizado

41. Resultado PPD: (1) reator forte (2) reator fraco (2) não reator

42. TGO inicial (tgoinic): (1) normal (2) alterado (3) NR

43. TGP inicial (tgpinic) : (1) normal (2) alterado (3) NR

44. BD inicial (bdrinic): (1) normal (2) alterado (3) NR

45. BT inicial (Bdinic): (1) normal (2) alterado (3) NR

46. Hepatite B : _____

47. Hepatite C : _____

48. HIV: (1) positivo (2) negativo (3) NR (4) IGN

49. Carga Viral (cv)

50. CD4: _____

51. CD8: _____

52. TGO15 – (1) normal (2) alterado (3) NR

53. TGPII15- (1) normal (2) alterado (3) NR

54. BD15- (1) normal (2) alterado (3) NR

55. BT15 - (1) normal (2) alterado (3) NR

56. TGO30- (1) normal (2) alterado (3) NR

57. TGP30- (1) normal (2) alterado (3) NR

58. BD30- (1) normal (2) alterado (3) NR

59. BD30- (1) normal (2) alterado (3) NR

60. TGO60- (1) normal (2) alterado (3) NR

61. TGP60- (1) normal (2) alterado (3) NR

62. BD60- (1) normal (2) alterado (3) NR

63. BT60- (1) normal (2) alterado (3) NR

64. Baciloscopia (BKinic): (1)+ (2)++ (3)+++ (4) neg (5) NR

Tratamento prévio: (1)RHZ (2)SEMZ (3)SHM (4)outros esquemas (5)nenhum

Onde (local de realização do tratamento prévio)? _____

65. Indicação para quimioprofilaxia (qp): (1)sim (2)não

66. Reações adversas no decorrer do tratamento (RAM): (1)sim (2)não

15 dias: _____

1º mês: _____

2º mês: _____

3º mês: _____

4º mês: _____

5º mês: _____

6º mês: _____

67. Hepatotoxicidade: (1)sim (2) não

68. Perfil acetilação NAT2: (1) rápido (2) lento

69. DOSE R _____ 73.DOSE H _____ 74.DOSE Z _____

75.Resultado tratamento atual: (1) cura (2)em tratamento (3)abandono (4)falência (5)mudança de diagnóstico (6)ignorado

8.2 APÊNDICE 2: Texto informativo ao paciente sobre a coleta e pesquisa. O paciente marca as opções e assina conforme seu interesse em participar do estudo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número do prontuário: _____

Protocolo Nº: _____

Título do projeto: Análise de polimorfismos no Citocromo P450 2E1 e GSTs e a variabilidade na resposta ao tratamento com RHZ em pacientes atendidos no Hospital Sanatório Partenon.

Financiamento: CDCT/FEPPS

Investigador Principal: Bióloga Taís Cestari de Brito

Objetivos e relevância do estudo

Os efeitos colaterais que o paciente pode apresentar quanto está usando remédio para o tratamento da tuberculose são um grande problema para saúde pública. Quando o paciente desenvolve efeitos colaterais graves estes podem ser causas de troca de tratamento, aumentado tempo de tratamento, hospitalização, aumento do tempo de permanência hospitalar e, até mesmo, de morte. A isoniazida (comprimido vermelho) é o principal antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose e também o remédio que mais causa efeitos colaterais graves. Esta pesquisa tem como objetivo a avaliação do fígado para saber se o paciente tem maior chance de ter efeitos colaterais quando está tomando o comprimido vermelho.

Procedimentos:

Os voluntários que decidirem participar da pesquisa serão entrevistados para responderem algumas questões relacionadas à sua saúde, seu perfil sócio-econômico, os fatores de risco que estão associados ao adoecimento por tuberculose, o consumo de bebidas alcoólicas e sintomas atuais. O voluntário será submetido à coleta de 10 mL de sangue que será realizada na face anterior do antebraço com agulha e seringa descartáveis, antecedido por antisepsia local com álcool e algodão (na primeira consulta). A amostra de sangue será utilizada para realização de testes genéticos além de dosagem de transaminases e bilirrubina. Será coletada também uma amostra de sangue (5mL) a cada consulta (mensal), nos dois primeiros meses de tratamento para análise dos níveis enzimáticos durante o tratamento.

Local do Estudo

Os procedimentos de coleta de sangue e entrevista serão realizados no Ambulatório do Hospital Sanatório Partenon em Porto Alegre e as análises genéticas e dosagens enzimáticas serão realizadas no CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS).

Riscos e desconfortos

Os riscos e desconfortos aos participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima. A coleta de sangue é de uma pequena quantidade (10mL) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. Os demais procedimentos (exames) serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos aos participantes do estudo.

Desistência na participação do estudo

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

Benefícios

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

Gostaria de ser comunicado de resultados desta pesquisa?

Sim, gostaria.

Não gostaria de ser comunicado dos resultados desta pesquisa.

Compensação financeira

Não haverá nenhum pagamento aos pacientes que concordarem em participar da pesquisa, bem como os participantes da pesquisa não terão nenhum custo adicional relacionado aos exames realizados.

Confidencialidade das informações

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

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas poderão ser esclarecidas pela equipe do estudo, através da Bióloga Taís Cestari de Brito em qualquer momento do estudo pelo telefone: 3352-0336.

Autorização para estocagem de material biológico:

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

Sim, permito.

Não permito que minha amostra seja utilizada em novos estudos.

Desejo que minha amostra seja destruída, após o fim do presente estudo.

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

Sim, gostaria.

Não gostaria de ser comunicado de novos resultados.

O significado de sua assinatura

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

Assinatura do voluntário Data:

Assinatura do entrevistador Data:

Assinatura do coordenador do estudo Data:

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

9. CURRICULUM VITAE RESUMIDO

DE BRITO, T. C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Taís Cestari de Brito

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 10/09/1980

Endereço profissional: Setor de Genética Forense, Laboratório de Perícias, Instituto Geral de Perícias. Av. Azenha, 255. CEP: 90160-000 - Porto Alegre, RS – Brasil

Telefone profissional: (51) 32336477

E-mail: taiscebr@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO

Graduação

Curso: Ciências Biológicas

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Período: 2001-2005

Pós-graduação *lato sensu*

Curso: Biologia e Genética Forense

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Período: 2007-2008

Título: Sistema de Gestão da Qualidade em Laboratórios de Genética Forense no Brasil.

Orientador: Clarice Sampaio Alho.

Pós-graduação *stricto sensu*

Curso: Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período: 2008-Atual

3. ESTÁGIOS

2004 – 2006. Iniciação científica. Bolsista de iniciação científica - Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose (2004-2005).

Instituição: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

Projeto: Análise dos genes *NAT2* e *CYP2E1* e correlação com o desenvolvimento de hepatotoxicidade em pacientes com tuberculose.

Fontes financiadoras: FAPERGS, FEPPS, CNPq, REDE-TB.

Orientadora: Maria Lúcia Rosa Rossetti.

Responsável: Lia Gonçalves Possuelo.

2002 – 2003. Iniciação Científica. Bolsista FAPERGS (2002).

Instituição: Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Fisiologia, ICBS/UFRGS.

Projetos: Determinação dos neurônios centrais que participam dos circuitos respiratórios e do controle cardíaco de *Megalobulimus abbreviatus*.

Identificação de conexões nervosas centrais do caracol pulmonado *Megalobulimus abbreviatus*.

Fontes financiadoras: FAPERGS, CNPq.

Orientadora: Denise Maria Zancan.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

- Prêmio Rubens Rodrigues, Menção Honrosa. IX Salão de Iniciação Científica do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul (2005). Análise de polimorfismos no gene *NAT2* em pacientes com tuberculose: um estudo piloto. Orientador: Maria Lúcia Rosa Rossetti.

- Destaque do XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS (2003). Identificação dos neurônios centrais que inervam o pneumóstoma e o coração de um caracol. Orientador: Denise Maria Zancan.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- 2010 – atual. Perita Químico Forense. Instituto Geral de Perícias do Rio Grande do Sul.
- 2007 – 2007. Pesquisador Local. II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Antituberculose. Ministério da Saúde.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. POSSUELO, L. G.; CASTELAN, J. ; DE BRITO, T. C.; RIBEIRO, A. W. ; CAFRUNE P. I.; PICON, P. D. ; SANTOS A. R.; TEIXEIRA R. L.; GREGIANINI, T. S.; HUTZ, M. H.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil.. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 64(7): 673-681, 2008.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. DE BRITO, T.C.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; GREGIANINI, T. S. ; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Variáveis Genéticas e Hepatotoxicidade em Pacientes Sob Tratamento para Tuberculose. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS, 2009, Porto Alegre.
2. POSSUELO, L. G.; CASTELAN, J.; BRITO, T. C.; RIBEIRO, A. W.; CAFRUNE P.I.; PICON, P.D.; SANTOS A.R; TEIXEIRA R.L.; GREGIANINI, T.S.; HUTZ, M.; ROSSETTI, M.L. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil.. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical., 2008, Porto Alegre.
3. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; JARCZEWSKI, C. A.; GREGIANINI, T. S.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Hepatotoxicidade ao RHZ e variabilidade do gene *CYP2E1* em pacientes em tratamento para tuberculose. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008, Porto Alegre.
4. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; JARCZEWSKI, C. A.; GREGIANINI, T. S.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Genetic Polymorphism in *CYP2E1* and drug-induced hepatotoxicity in Tuberculosis Patients from Porto Alegre. In: XI São Paulo Research Conference - Medicina Molecular e Farmacogenética, 2008, São Paulo.
5. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; JARCZEWSKI, C.; GREGIANINI, T.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Frequência de Polimorfismos em *CYP2E1* e Toxicidade Hepática em Pacientes com Tuberculose. In: X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS, 2008, Porto

Alegre.

6. POSSUELO, L. G.; BRITO, T. C.; RIBEIRO, A. W.; JARCZEWSKI, C. A.; SANTOS, ADALBERTO R.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Genotipagem de *Nat2* e Associação com Hepatotxicidade ao RHZ em Pacientes com Tuberculose Atendidos em Hospital de Referência no Rio Grande do Sul. Relato Preliminar. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.
7. POSSUELO, L. G.; BRITO, T. C.; PICON, P. D.; CASTELAN, J.; JARCZEWSKI, C. A.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. Avaliação de Fatores de Risco para Hepatotxicidade ao RHZ em Pacientes em Tratamento para Tuberculose no Sul do Brasil. In: XV Congresso Brasileiro de Infectologia, 2007, Curitiba.
8. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; GREGIANINI, T. S.; JARCZEWSKI, C.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Variáveis Genéticas em *CYP2E1* e Relação com o Desenvolvimento de Hepatotxicidade em Pacientes em Tratamento Ambulatorial para Tuberculose. In: XV Congresso Brasileiro de Infectologia, 2007, Curitiba.
9. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; ARLINDO, E. M.; GREGIANINI, T. S.; JARCKZEWSKI, C. A.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Caracterização de SNPs no gene *CYP2E1* em pacientes com TB no Sul do Brasil. In: II Encontro Nacional de Tuberculose, 2006, São Paulo.
10. CASTELAN, J.; POSSUELO, L. G.; BECKER, A.; BRITO, T. C.; ARLINDO, E. M.; JARCKZEWSKI, C. A.; ROSSETTI, M. L. R. Avaliação Bioquímica e Imunológica de possíveis alterações induzidas por tuberculostáticos em pacientes do Hospital Sanatorio Partenon. In: II Encontro Nacional de Tuberculose, 2006, São Paulo.
11. RIBEIRO, A. W.; BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; ARLINDO, E. M.; GREGIANINI, T. S.; JARCZEWSKI, C. A.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. Análise dos polimorfismos no gene *CYP2E1* e correlação com hepatotoxicidade em pacientes em tratamento para tuberculose. In: X Salão de Iniciação Científica do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, 2006, Porto Alegre
12. RIBEIRO, A. W.; POSSUELO, L. G.; BRITO, T. C.; ARLINDO, E. M.; GREGIANINI, T. S.; JARCZEWSKI, C. A.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. Avaliação da frequência dos polimorfismos dos genes *CYP2E1* e *NAT2* em pacientes com tuberculose: um estudo preliminar. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006, Porto Alegre.
13. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; TEIXEIRA, R. L. F.; GREGIANINI, T. S.; JARCKZEWSKI, C. A.; SANTOS, A. R.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Análise de Polimorfismos no Gene *NAT2* em Pacientes com Tuberculose: Um Estudo Piloto. In: IX Salão de Iniciação Científica do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, 2005, Porto Alegre. III Encontro Científico Anual do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, 2005.
14. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; SANTOS, A. R.; TEIXEIRA, R. L. F.; JARCKZEWSKI, C. A.; ROSSETTI, M. L. R.; ZAHA, A. Polymorphism analysis in *NAT2* gene of tuberculosis patients from Porto Alegre: a preliminary study. In: 51º

Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia.

15. DE BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; TEIXEIRA, R. L. F.; GREGIANINI, T. S.; JARCKZEWSKI, C. A.; SANTOS, A. R.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Análise de Polimorfismos no gene *NAT2* em pacientes em tratamento para tuberculose. In: XVI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005, Porto Alegre.
16. POSSUELO, L. G.; BRITO, T. C.; JARCKZEWSKI, Carla A ; GREGIANINI, T. S.; SANTOS, A. R.; TEIXEIRA, R. L. F ; ROSSETTI, M. L. R. ; ZAHA, A . Molecular analysis of the *NAT2* polymorphisms in tuberculosis patients from Porto Alegre: a preliminary study. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.
17. BRITO, T. C.; POSSUELO, L. G.; GREGIANINI, T. S.; JARCKZEWSKI, C. A.; ZAHA, A. Genotipagem de *CYP2E1* em pacientes sob tratamento para tuberculose: um estudo piloto. In: VI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2005, Porto Alegre.
18. OLIVEIRA, D. F.; BRITO, T. C.; FRAGA, L. S.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. Localização dos neurônios dos gânglios cerebrais e subesofageais que participam do controle da respiração de um caracol terrestre. In: XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2004, Águas de Lindóia.
19. DE BRITO, T. C.; FRAGA, L. S.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. Identificação dos neurônios centrais que inervam o pneumóstoma e o coração de um caracol. In: XVI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2003, Porto Alegre.
20. DE BRITO, T. C.; MASTELLA, L. S.; BARBOSA, L. M.; TRINCA, C. S.; ZANCAN, D. M. Identificação de possíveis interneurônios envolvidos em circuitos nervosos centrais do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus*. In: XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre.

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](#)