



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

MARIA JOSÉ CHIABAI

**ESTUDO SOBRE ACETILAÇÃO DA ISONIAZIDA EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE PULMONAR E DA SUA IMPLICAÇÃO NA REDUÇÃO OU
ELIMINAÇÃO DA CARGA BACILAR NO ESCARRO**

**Vitória
2013**

MARIA JOSÉ CHIABAI

**ESTUDO SOBRE A ACETILAÇÃO DA ISONIAZIDA EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE PULMONAR E DA SUA IMPLICAÇÃO NA REDUÇÃO OU
ELIMINAÇÃO DA CARGA BACILAR NO ESCARRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Vitória
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Chiabai, Maria José, 1986-

C532e Estudo sobre acetilação da isoniazida em pacientes com tuberculose pulmonar e da sua implicação na redução ou eliminação da carga bacilar no escarro / Maria José Chiabai. – 2013.

98 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Pulmões – Tuberculose. 2. Meios de cultura (Biologia). 3. Escarros. 4. Acetilação. I. Palaci, Moisés. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



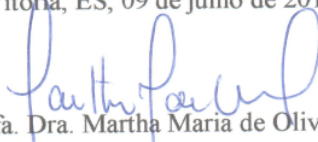
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

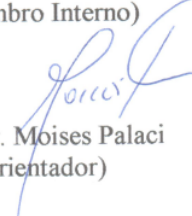
A mestrande MARIA JOSÉ CHIABAI apresentou a dissertação intitulada “ESTUDO SOBRE ACETILAÇÃO DA ISONIAZIDA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR E DA SUA IMPLICAÇÃO NA REDUÇÃO OU ELIMINAÇÃO DA CARGA BACILAR NO ESCARRO” em sessão pública, no dia 09 de julho de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu ☒ **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica MARIA JOSÉ CHIABAI a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 09 de julho de 2013


Prof. Dra. Martha Maria de Oliveira
(Membro Externo)


Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
(Membro Interno)


Prof. Dr. Moises Palaci
(Orientador)

*Dedico esta dissertação, à vovó Ana e ao vovô Iluminato,
que lembro com muita saudade e aos meus pais, Luniana e Gilberto, que sempre me
apoíaram carinhosamente e me levaram a ser a pessoa que sou hoje. O incentivo, a
compreensão e as palavras de conforto foram indispensáveis nesta etapa importante. Amo
muito vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser TUDO na minha vida e por ter me dado forças para ser persistente e confiante durante toda esta jornada porque “nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus” (Aristóteles).

Ao professor Moisés Palaci, meu orientador, pela competência científica e por tudo que aprendi com ele. Obrigada pela paciência, incentivo, oportunidade e por acreditar no meu trabalho!

À Raquel, Adalberto, Harrison e Philip do Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias (Fiocruz), por abrirem as portas do laboratório para a concretização deste trabalho e por me acolherem tão gentilmente.

À Solange, que me acompanhou durante o tempo que estou no laboratório e me ajudou e apoiou quando precisei.

À professora Ethel e ao Luiz Paulo, que me auxiliaram na análise estatística. A ajuda de vocês foi fundamental!

Aos amigos de laboratório, Débora (Arolda) que se tornou minha amiga; Luiz Guilherme, que se tornou meu companheiro de risadas e de caronas; Pedro, que me forneceu muitos chocolates para me deixar bem feliz; Renata, Tatiana e Fabíola pelas horas e horas de sessões de terapia e pela gentileza de sempre me ajudarem.

Às amigas do “laboratório que me adotou”: Giuliana, Juliana, Mariela e Renata, pelos engraçados momentos de descontração, pelos almoços e pela grande amizade a qual construímos.

Aos funcionários do NDI, em especial Deth, João, Lau, Leduc e Roseane, pela atenção e disponibilidade sempre que precisei. Agradeço pelas ajudas nas horas de desespero...

Aos meus muito mais que amigos, Beto e Rogério! Sem vocês, eu não conseguiria. Por todos os dias que me aguentaram mesmo quando eu estava rabugenta e brigando com vocês, mas isso tudo é amor!!!

Ao meu irmão, João Paulo, pelo incentivo e carinho que sempre me deu.

Ao meu namorado pela paciência, compreensão, amor e companheirismo.

À Allen e Máira, que convivo durante anos e são mais que minhas irmãs. Sou grata por tudo!! A amizade será eterna!

À CAPES, CNPq e NDI pelo apoio financeiro.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

“Os perdedores veem os raios e se amedrontam, os vencedores veem a chuva e com ela a oportunidade de cultivar.”

Augusto Curry

RESUMO

A N-acetiltransferase 2 é a principal enzima responsável pelo metabolismo e inativação da isoniazida no organismo humano. Mutações no gene *NAT2* levam a 3 perfis genotípicos de acetilação que alteram os níveis séricos do fármaco: acetiladores lentos, intermediários e rápidos, o que pode alterar o desfecho terapêutico. O objetivo do estudo foi investigar se os diferentes perfis podem influenciar no tempo de negatificação da cultura de escarro, e se existe correlação entre carga bacilar e gravidade da doença com tempo de conversão da cultura. A população de estudo foi composta por 62 pacientes, que tiveram seus DNAs sequenciados para identificação de mutações no gene *NAT2* e seus perfis de acetilação determinados. A análise genotípica detectou 10 SNPs, sendo as mutações 341 T>C (39,65%) e 481 C>T (38,71%) as mais frequentes. A determinação das variantes alélicas identificou *NAT2*5B* (29,03%), *NAT2*6A* (23,39%) e *NAT2*4* (24,19%) como os alelos mais frequentes e *NAT2*5B/*5B* como o genótipo mais frequente (20,4%). Dentre os 62 pacientes, foi possível correlacionar tempo de negatificação da cultura e perfil de acetilação entre 43 deles, os quais 58,3% e 55,6% tiveram o genótipo lento com maior frequência no mês 1 e mês 3, respectivamente. Por meio de dados microbiológicos, a carga bacilar e a gravidade da doença também foram comparadas com o tempo de negatificação, indicando que os pacientes com doença moderada ou avançada (76,7%) e aqueles com carga bacilar alta (60,4%), não tiveram associação estatística com o tempo de conversão da cultura. Por último, curvas de crescimento de isolados de *M. tuberculosis* de pacientes foram construídas para verificar possíveis diferenças na duração da fase lag entre os isolados, porém não foi observada diferença estatística entre elas. Com base nos resultados encontrados, verifica-se que não existe associação entre o perfil de acetilação do paciente, a carga bacilar, a gravidade da doença e o tempo de negatificação da cultura de escarro.

Palavras-chave: Tuberculose, meios de cultura, escarros, acetilação.

ABSTRACT

N-acetyltransferase 2 is the main enzyme responsible for the metabolism and inactivation of isoniazid in humans. Mutations in the gene NAT2 lead to 3 profiles of acetylation genotype that modify serum levels of the drug: slow acetylators, intermediate and fast, which can change the therapeutic outcome. The aim of the study was to investigate whether different profiles can influence the time of negativation sputum culture, and if there is a correlation between bacterial load and disease severity with time to culture conversion. The study population comprised 62 patients who had their DNAs sequenced for identification of mutations in the gene NAT2 and to determine the acetylation. Genotypic analysis detected 10 SNPs, and SNPs 341 T>C (39.65%) and 481 C>T (38.71%) were the most frequent. The determination of allelic variants identified NAT2*5B (29.03%), NAT2*6A (23.39%) and NAT2*4 (24.19%) as alleles more frequent and NAT2*5B/5B as the most frequent genotype (20.4%). Among 62 patients, it was possible to correlate time of negative culture and acetylation profile of 43 them, which 58.3% and 55.6% had genotype slow with greater frequency in month 1 and months 3, respectively. Through microbiological data, the bacterial load and severity of disease were also compared with the time of negativation, indicating that patients with moderate or advanced disease (76.7%) and those with high bacterial load (60.4%) had no statistical association with the conversion time of culture. Finally, growth curves of strains of *M. tuberculosis* of patients were constructed to evaluate possible differences in the duration of the lag phase between the isolates, but there was no statistical difference between them. Based on these results, it is found that there is no association between the profile acetylation of the patient, bacterial load and the severity of the illness and the time of negative sputum cultures.

Keywords: Tuberculosis, culture medium, sputum, acetylation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABP	Atividade Bactericida Precoce
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
C	Citosina
CCI	Controle de Concentração do Inóculo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
dNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfato
EMB	Etambutol
FF	Acetilador Rápido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Acetilador Intermediário
G	Guanina
GU	Unidades de Crescimento (<i>Growth Units</i>)
HIV	vírus da imunodeficiência humana (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
INH	Isoniazida
InhA	Enzima enoil ACP redutase
KasA	Enzima β -cetoacil ACP sintase
NALC	N-Acetil-L-Cisteína
NAP	p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona
NAT	N-acetiltransferase
NAT-1	N-acetiltransferase 1
NAT-2	N-acetiltransferase 2
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
OADC	Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
OMS	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

PAS	Ácido para-aminosalicílico
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
rpm	Rotações por minuto
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SM	Estreptomicina
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SS	Acetilador Lento
T	Timina
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Superresistente a Drogas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TTP	Tempo Para Positivização (<i>Time To Positivity</i>)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema básico para o tratamento de TB no Brasil. O número que antecede a sigla indica o número de meses de tratamento; dose por comprimido: R (Rifampicina) = 150mg; H (Isoniazida) = 75mg; Z (Pirazinamida) = 400mg; E (Etambutol) = 275mg. (SBPT, 2009).....	24
Tabela 2. Alelos <i>NAT2</i> humanos. A mutação que caracteriza cada grupo está em letra vermelha.	37
Tabela 3. Sequência dos Iniciadores (Teixeira <i>et al.</i> , 2007).....	50
Tabela 4. Frequência de mutações pontuais no gene <i>NAT2</i> na população de estudo.....	64
Tabela 5. Frequência de variantes alélicas de <i>NAT2</i>	65
Tabela 6. Perfis de acetilação e genótipos dos pacientes do estudo. FF, FS e SS = fenótipo homozigoto rápido, heterozigoto intermediário e homozigoto lento.....	66
Tabela 7. Distribuição das variáveis demográficas e clínicas para os grupos classificados de acordo com o tempo de negatificação da cultura.....	67
Tabela 8. Comparação do Perfil de Acetilação da INH com o Tempo de Negatificação da Cultura de Escarro.....	68
Tabela 9. Comparação do Tempo de Negatificação da Cultura de Escarro com Carga Bacilar.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas da isoniazida (I) e do ácido isonicotínico (II). (Adaptado de Riley, 1996).....	27
Figura 2. Via de N-acetilação da INH.....	28
Figura 3. Esquema que mostra a ativação e inativação da INH dentro da célula micobacteriana. INH é um pró-fármaco e requer a ativação pela catalase-peroxidase (gene <i>KatG</i>). A enzima NAT pode acetilar a INH, o que resulta em inatividade terapêutica (Adaptado de Bodiguel <i>et al</i> , 2001).....	30
Figura 4. a, SNPs. Mostra um pedaço da fita de DNA de quatro versões da mesma região do cromossomo em pessoas diferentes. A maioria da sequência do DNA é idêntica nesses cromossomos, porém em três bases ocorrem variações. Cada SNP tem dois possíveis alelos; o primeiro SNP no painel a tem os alelos C e T. b, Haplótipos. Um haplótipo é composto de uma combinação particular de SNPs próximos. Apenas as bases que variam são mostradas, incluindo os três SNPs que aparecem no painel a . (Adaptado de The International HapMap Project, 2003).....	33
Figura 5. Exemplo de haplótipos. O símbolo (*) representa mutações defectivas e o símbolo (X) representa mutações funcionais. (Adaptado de Sabbagh e Darlu, 2005).....	34
Figura 6. Representação esquemática do cromossomo 8p22 mostrando a região de <i>NAT2</i> . (Adaptado de Sim <i>et al</i> , 2000).....	35
Figura 7. Esquema que mostra o benefício de ajuste de dose baseado no genótipo. Indivíduos que apresentam baixa atividade metabolizadora de drogas apresentam maior probabilidade de desenvolverem efeitos adversos. Em contrapartida, indivíduos que metabolizam rapidamente têm maior tendência a apresentarem falha terapêutica. c: concentração da droga; t: tempo. (Adaptado de Kirchheiner <i>et al</i> ; 2005).....	36
Figura 8. Esquema das amplificações da região codificante de <i>NAT2</i> que mostra os três fragmentos gerados para sequenciamento a partir dos iniciadores NAT2EF, NAT2ER, NAT2IF e NAT2IR.....	49
Figura 9. Fluxograma dos pacientes selecionados para o estudo.....	58

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1%. Extração de DNA genômico humano a partir de amostras de escarro.....59

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando a amplificação por meio de PCR. No gel superior, as bandas positivas possuem 560 pb; no gel do meio, as bandas positivas possuem 685 pb; no gel inferior, as bandas positivas possuem 1093 pb. Os 3 géis são referentes às mesmas amostras. Primeiro poço de cada gel: Peso molecular 100 pb (Gene Ruler 100 pb Plus DNA ladder – Thermo Scientific). Poço 1: Controle positivo. Poços 2 – 22: Amostras de pacientes. Poço 23: Controle negativo.....60

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando a purificação do produto direto do PCR. Os poços de 1 – 33 são de amostras de pacientes, sendo que: Poços 1 – 15 possuem bandas positivas com 1093 pb; poços 16 – 24 possuem bandas positivas com 560 pb e poços 25-33 possuem bandas positivas com 685 pb. O primeiro poço de cada gel (superior e inferior) contém o peso molecular (Gene Ruler 100 pb Plus DNA ladder – Thermo Scientific).....61

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando a purificação do produto a partir do gel preparatório. Poços 1 – 6 possuem bandas positivas com 560 pb; poços 7 – 11 possuem bandas positivas com 685 pb. L: peso molecular (Gene Ruler 100 pb Plus DNA ladder – Thermo Scientific).....62

Figura 14. Interface do programa SeqScape v.2.5. Nesta imagem são visualizados a sequência consenso, a sequência referência e o alinhamento da sequência de DNA de diversos pacientes.....63

Figura 15. Eletroferograma visualizado dentro do programa SeqScape v.2.5. A seta da esquerda que mostra dois picos indica uma amostra heterozigota; a seta da direita que mostra um pico indica uma amostra homozigota.....63

Figura 16. Curvas de crescimento em Middlebrook 7H9 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negativação de suas culturas de escarro no mês 1 (n=10). C01-C10: isolado referente a cada paciente.....69

Figura 17. Curvas de crescimento em Middlebrook 7H9 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negativação de suas culturas de escarro no mês 3 (n=8). C11-C18: isolado referente a cada paciente.....70

Figura 18. Curvas de crescimento em BACTEC MGIT 960 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negativação de suas culturas de escarro no mês 1 (n=10). C01-C10: isolado referente a cada paciente.....71

Figura 19. Curvas de crescimento em BACTEC MGIT 960 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negativação da cultura de escarro no mês 3 (n=8). C11-C18: isolado referente a cada paciente.....71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISAO DE LITERATURA.....	22
2.1 Tratamento da Tuberculose.....	23
2.2 Isoniazida.....	26
2.2.1 Farmacocinética, Metabolismo e Toxicidade.....	27
2.2.2 Mecanismo de Ação.....	29
2.2.3 Farmacogenética e Isoniazida.....	31
2.3 Justificativa.....	38
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	44
4.2 Estratégia do Estudo.....	44
4.2.1 Delineamento do Estudo.....	44
4.2.2 Local do Estudo.....	44
4.3 Caracterização dos Pacientes.....	45
4.3.1 Critérios de Inclusão.....	45
4.3.2 Critérios de Exclusão.....	46
4.4 Amostra Clínica.....	46
4.4.1 Escarro.....	46
4.4.2 Sangue Total.....	46
4.5 Caracterização do Tempo de Negativação da Cultura de Escarro.....	46
4.6 Caracterização dos Pacientes de Acordo com a Carga Bacilar Presente no Escarro.....	47

4.7 Caracterização dos Genótipos de Acetilação.....	48
4.7.1 Extração do DNA Genômico.....	48
4.7.2 Confirmação da extração do DNA genômico.....	48
4.7.3 Genotipagem do Gene <i>NAT2</i>	48
4.7.3.1 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR - <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	49
4.7.3.2 Detecção dos Fragmentos Amplificados de PCR.....	50
4.7.3.3 Purificação dos Fragmentos a partir do Produto Direto de PCR.....	51
4.7.3.4 Purificação dos Fragmentos a partir do Gel Preparatório de Agarose 1,5%.....	51
4.7.3.5 Detecção do DNA Purificado.....	52
4.7.3.6 Reação de Sequenciamento.....	52
4.7.3.6.1 Precipitação da Reação de Sequenciamento.....	53
4.7.3.7 Sequenciamento.....	53
4.7.3.8 Análise Computacional das Sequências	53
4.8 Curvas de Crescimento.....	54
4.8.1 Preparo do Cultivo Inicial em Fase Log em Meio de Cultura Líquido Middlebrook 7H9 (T0).....	54
4.8.2 Análise da Curva de Crescimento dos Isolados de <i>M. tuberculosis</i> em Meio de Cultura Líquido Middlebrook 7H9.....	55
4.8.3 Análise da Curva de Crescimento dos Isolados de <i>M. tuberculosis</i> em BACTEC™ MGIT™ 960.....	56
4.9 Análise Estatística.....	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1 População de Estudo.....	58
5.2 Extração de DNA Genômico a Partir de Amostras de Escarro.....	59
5.3 Amplificação da Região Codificante do Gene <i>NAT2</i> por Técnica de PCR.....	59
5.4 Purificação dos Fragmentos a Partir do Produto Direto de PCR.....	61
5.5 Reação de Sequenciamento e Identificação de SNPs no Gene <i>NAT2</i>	62
5.6 Perfil de SNPs Entre a População Estudada.....	64
5.7 Determinação das Variantes Alélicas de <i>NAT2</i>	64

5.8 Caracterização Genotípica do Gene <i>NAT2</i> e Determinação Preliminar do Perfil de Acetilação.....	65
5.9 Caracterização da População Seleccionada Para Comparação do Perfil de Acetilação de INH com o Tempo de Negativação da Cultura de Escarro e com a Carga Bacilar.....	66
5.10 Comparação do Perfil de Acetilação de INH com o Tempo de Negativação da Cultura de Escarro.....	68
5.11 Comparação entre Tempo de Negativação da Cultura de Escarro e Carga Bacilar.....	68
5.12 Análise da Curva de Crescimento dos Isolados de <i>M. tuberculosis</i> em Meio de Cultura Líquido Middlebrook 7H9.....	69
5.13 Análise da Curva de Crescimento de Isolados de <i>M. tuberculosis</i> em BACTEC™ MGIT™ 960.....	70
 6. DISCUSSÃO.....	 72
 7. CONCLUSÕES.....	 79
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 81
 ANEXOS.....	 93

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que pode se apresentar restrita ao pulmão (tuberculose pulmonar) ou disseminada para outros órgãos (tuberculose extrapulmonar). Ela é transmitida de pessoa a pessoa via aerossóis expelidos dos pulmões durante a tosse, fala ou espirro de pessoas com a doença respiratória ativa (BRASIL, 2011; WHO, 2012a).

O bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, ao ser inalado, é fagocitado pelos macrófagos alveolares e geralmente destruído. As micobactérias que escapam da destruição intracelular se multiplicam e levam ao rompimento dos macrófagos. Como consequência, as células inflamatórias migram para o local da infecção, os monócitos se diferenciam em macrófagos que fagocitam os bacilos porém não os destroem. Assim, as micobactérias começam a crescer em fase logarítmica e os macrófagos se acumulam, porém ocorrem pequenos danos nos tecidos (VAN CREVEL, OTTENHOFF e VAN DER MEER, 2002).

Após 2 a 3 semanas, desenvolve-se o sistema imune do hospedeiro e a infecção torna-se latente quando ocorre a formação de necrose caseosa na lesão o que impede o crescimento extracelular da micobactéria. A doença pode progredir em algum momento e até se disseminar via hematogênica após meses ou anos devido a possíveis falhas no sistema imunológico do hospedeiro (VAN CREVEL, OTTENHOFF e VAN DER MEER, 2002).

Os sinais e sintomas da tuberculose pulmonar ativa – tosse persistente, dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre vespertina e suores noturnos - são comuns a várias enfermidades, porém a extensão temporal dessas manifestações é um indicativo específico da doença (BRASIL, 2011; WHO, 2012a, 2012b).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2011 surgiram 8,7 milhões de novos casos da doença, o que corresponde a 125 casos por 100.000 habitantes, e ocorreram 1,4 milhões de mortes por TB (WHO, 2012a). Cerca de 95% dos casos e das mortes ocorrem nos países em desenvolvimento (WHO, 2012b). Um terço da

população mundial está infectado com o bacilo, porém apenas 5 a 10% delas irão desenvolver a doença ativa dentro de 1 a 2 anos após a infecção (TB primária) ou após esse tempo (TB pós-primária) (VAN CREVEL, OTTENHOFF e VAN DER MEER, 2002; WHO, 2012b).

O diagnóstico é de fundamental importância para prevenir a doença e para obter menores taxas de mortalidade e de sequelas pulmonares. A maioria das micobactérias apresenta o crescimento lento. Logo, a baciloscopia desempenha um papel fundamental no diagnóstico precoce da TB, pois os resultados são obtidos dentro de poucas horas (ABE, 2003). Porém essa técnica apresenta limitações como baixa sensibilidade (61%) (LEE *et al.*, 2003). Os exames de cultura são métodos de elevada sensibilidade e especificidade, sendo considerados o padrão-ouro e o uso combinado de um meio sólido e um meio líquido é o mais indicado em um laboratório para o diagnóstico da tuberculose (ALCAIDE *et al.*, 2000; CEYHAN, SIMSEK e TARHAN, 2012). Os sistemas automatizados baseados em meio líquido como o BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System (Becton Dickinson, Sparks, MD), mostram ser significativamente melhores para o isolamento primário do bacilo de amostras clínicas (ABE, 2003), com sensibilidade de 100% do que meios sólidos a base de ovo (Ogawa ou Lowenstein-Jensen) com sensibilidade de 87,2% segundo Lee e colaboradores (2003) e de 92,7% de acordo com Ceyhan e colaboradores (2012). Além disso, existem os métodos moleculares para o diagnóstico que fornecem resultados dentro de 24 a 48 horas pois não precisam de esperar o crescimento da bactéria, porém são ainda relativamente caros e de difícil execução, o que impossibilita seu uso em laboratórios de rotina (PALOMINO, 2006).

A tuberculose é uma doença curável em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a operacionalização do tratamento. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos fundamentais para prevenir a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, o que promove a cura dos pacientes e a quebra na cadeia de transmissão (PALOMINO, LEAO e RITACCO, 2007; BRASIL, 2011).

Revisão de Literatura

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 Tratamento da Tuberculose

A estreptomicina (SM), descoberta em 1944, foi o primeiro fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose. Porém, logo se observou que o *M. tuberculosis* era capaz de desenvolver resistência a este fármaco e percebeu-se que a monoterapia não proporcionaria a cura efetiva da doença. Devido a este fato, em 1950, foi introduzido o ácido para-aminosalicílico (PAS) ao tratamento e os dois fármacos passaram a ser usadas em combinação para prevenir o surgimento de resistência do bacilo (CROFTON e MITCHISON, 1948; PALOMINO, LEAO e RITACCO, 2007). No ano de 1953, 40 anos após sua descoberta, a isoniazida (INH) foi introduzida no esquema terapêutico e se tornou a base do tratamento por quase um década. Porém, o esquema terapêutico requeria um tempo muito prolongado de tratamento de 24 meses, o que levou, em 1960, à substituição do PAS pelo etambutol (EMB), encurtando o tempo de terapia para 18 meses. Já na década de 1960, com o advento da descoberta da rifampicina (RMP), desenvolveu-se um novo esquema poliquimioterápico composto por INH, RMP, EMB e SM, diminuindo ainda mais o tempo para 9 meses. Outra melhora significativa ocorreu em 1980, quando a pirazinamida (PZA) foi introduzida à terapia anti-tuberculose, o que reduziu o tempo total de tratamento para apenas 6 meses (FOX, ELLARD e MITCHISON, 1999; REDON *et al.*, 2006; PALOMINO, LEAO e RITACCO, 2007).

Na tuberculose, a poliquimioterapia é explicada por 2 características biológicas: primeira, o tratamento da TB ativa com um único fármaco resulta na seleção de bacilos resistentes e, conseqüentemente, falha terapêutica. Segunda, características biológicas específicas dos bacilos levam a mutações que resultam em populações diferentes (cada uma com um padrão diferente de susceptibilidade aos fármacos) coexistindo em um mesmo paciente (SHAMPUTA *et al.*, 2006; PALOMINO, LEAO e RITACCO, 2007).

Diante dessas características, o tratamento da TB tem 2 focos principais: primeiro, a necessidade de matar rapidamente os bacilos extracelulares que estão nas cavidades dos pulmões os quais são metabolicamente ativos e se dividem

continuamente; com isso, a negativação do escarro é mais rápida quebrando, portanto, a cadeia de transmissão. Segundo, a necessidade de eliminar os bacilos que se replicam mais lentamente e os bacilos que vivem dormentes no meio intracelular em outros tecidos do hospedeiro, que podem persistir e levar à recidiva da doença (MITCHISON, 2000; ONYEBUJOH *et al.*, 2005; PALOMINO, LEAO e RITACCO, 2007).

O tratamento da tuberculose é complexo com a administração de vários medicamentos por um determinado período de tempo mesmo depois de melhora clínica aparente (RODRIGUES *et al.*, 2007).

No Brasil, o esquema básico de fármacos para TB pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite) bem como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono e a sua posologia recomendados pela III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT) baseia-se no uso de INH, RMP, PZA e EMB, com apresentação farmacológica em comprimidos de doses fixas combinadas desses 4 medicamentos (Tabela 1). Essa recomendação é preconizada pela OMS e é utilizada na maioria dos países, para adultos e adolescentes.

Tabela 1. Esquema básico para o tratamento de TB no Brasil. O número que antecede a sigla indica o número de meses de tratamento; dose por comprimido: R (Rifampicina) = 150mg; H (Isoniazida) = 75mg; Z (Pirazinamida) = 400mg; E (Etambutol) = 275mg. (SBPT, 2009).

Esquema	Fármacos	Peso	Dose	Meses
2RHZE Fase intensiva	RHZE	Até 20kg	R: 10mg/kg/dia H: 10mg/kg/dia Z: 35mg/kg/dia E: 25mg/kg/dia	2
		20-35kg	2 comprimidos	
		36-50kg	3 comprimidos	
		> 50kg	4 comprimidos	
4RH Fase de manutenção	RH	Até 20kg	R: 10mg/kg/dia H: 10mg/kg/dia	4
		20-35kg	2 comprimidos	
		36-50kg	3 comprimidos	
		> 50kg	4 comprimidos	

Os fármacos anti-TB de primeira linha garantem o sucesso terapêutico, desde que o tratamento seja realizado corretamente. INH e RMP são os medicamentos de maior ação bactericida, sendo ativas em todas as populações bacilares sensíveis, quer intracavitárias, nos granulomas ou intracelulares. RMP é o medicamento com maior poder esterilizante. PZA e SM também são bactericidas contra algumas populações de bacilos. PZA é ativa apenas em meio ácido (intracelular ou no interior dos granulomas). SM é bactericida contra os bacilos de multiplicação rápida (localizados no interior das cavidades pulmonares). EMB é bacteriostático e utilizado em associação com medicamentos mais potentes para prevenir a emergência de bacilos resistentes (OMS, 2006; BRASIL, 2011).

Embora o esquema proposto seja altamente eficiente, observa-se, com frequência variável, ineficácia do tratamento o que pode levar ao desenvolvimento de formas resistentes da doença, denominadas de tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) - doença causada por *M. tuberculosis* que é resistente a pelo menos INH e RMP com ou sem resistência a outros fármacos anti-TB (VEEN, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2007; KANT *et al.*, 2010).

Os casos de TB-MDR são muito mais difíceis de tratar. A quimioterapia baseia-se em medicamentos de segunda linha que apresentam mais frequentemente efeitos adversos, são mais caros e menos eficazes do que os fármacos de primeira linha (INH, RMP, PZA e EMB). Os medicamentos de segunda linha incluem aminoglicosídeos (canamicina e amicacina), polipeptídeo (capreomicina), PAS, cicloserina, tioamidas (etionamida e protionamida) e várias fluoroquinolonas (moxifloxacino, levofloxacino e gatifloxacino) (PALOMINO, LEAO e RITACCO, 2007). Além disso, a duração do tratamento é maior do que o esquema padronizado e deve ser continuado até 9 meses a 1 ano depois que o escarro foi bacteriologicamente negativo (ONYEBUJOH *et al.*, 2005; KANT *et al.*, 2010). Entretanto, cerca de dois terços dos pacientes com TB-MDR alcançam a cura (ORENSTEIN *et al.*, 2009; LAWN e ZUMLA, 2011).

Outro problema ainda mais grave é a tuberculose super resistente a drogas (TB-XDR) que é definida como a doença causada por *M. tuberculosis* resistente a pelo menos RIF, INH, um fármaco injetável de segunda linha (capreomicina, canamicina

ou amicacina) e fluoroquinolona (CDC, 2006). O tratamento para essa forma de resistência deve ser individualizado com fármacos de reserva (capreomicina, moxifloxacino, PAS e etionamida) (SBPT, 2009).

2.2 Isoniazida

Isoniazida é bactericida e possui atividade específica contra *M. tuberculosis* e menor atividade contra patógenos oportunistas do complexo *Mycobacterium avium* (MDLULI *et al.*, 1998). Possui baixo custo, excelente penetração intracelular e biodisponibilidade e pequeno espectro de ação, o que permite que ela seja o agente antimicobacteriano ideal (RILEY, 1996).

A morte microbiana por isoniazida cessa após 2 a 3 dias de iniciada a terapia. Como resultado, a atividade antimicrobiana nos pacientes é medida por meio da ABP (Atividade Bactericida Precoce) de um medicamento que é definida como a diminuição, durante os 2 primeiros dias de tratamento, em $\log_{10}$ na contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de *Mycobacterium tuberculosis* no escarro de pacientes com tuberculose pulmonar confirmada por amostras de escarro com baciloscopias positivas (JINDANI *et al.*, 1980; DONALD *et al.*, 2004). Sirgel e colaboradores (2000) mostraram que a ABP da INH é maior quando comparada com a ABP da rifampicina como confirmado em outros estudos (JINDANI *et al.*, 1980; SIRGEL *et al.*, 1993; DONALD *et al.*, 1997), o que indica que INH é o fármaco mais bactericida nos primeiros dias do tratamento para tuberculose (SIRGEL *et al.*, 2000).

Hidrazida do ácido isonicotínico (isoniazida – $C_6H_7N_3O$) (Figura 1) foi sintetizada pela primeira vez por Meyer e Mally a partir do etilisonicotinato e hidrato de hidrazina, em 1912, porém sua atividade terapêutica só foi descoberta 40 anos mais tarde (MEYER e MALLY, 1912). No ano de 1952, iniciou-se o primeiro ensaio clínico com a isoniazida em que Robitzek e Selikoff mostraram que a droga era eficaz no tratamento da TB humana (ROBITZEK, SELIKOFF e ORNSTEIN, 1952; SELIKOFF e ROBITZEK, 1952).

Uma vez que a isoniazida é uma base fraca, ela é solúvel tanto em água quanto em lipídeos, não se liga significativamente a proteínas e se difunde facilmente através da membrana lipídica (BOXENBAUM *et al.*, 1975). Sua atividade não é afetada pela variação de pH na faixa de 5.0 a 8.0 (MITCHISON, 1952). Se difunde com facilidade nos macrófagos (JOHNSON *et al.*, 1980) sendo eficaz tanto contra bacilos intracelulares quanto extracelulares (MACKANESS e SMITH, 1953).

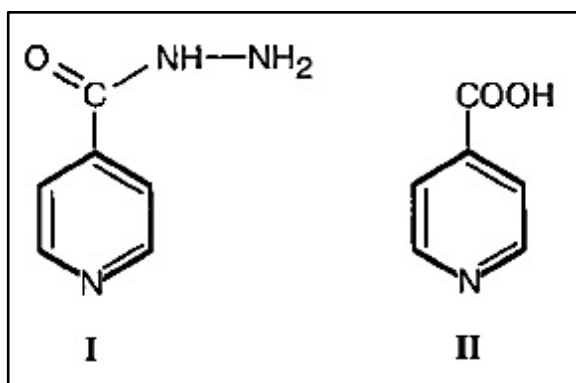


Figura 1. Estruturas químicas da isoniazida (I) e do ácido isonicotínico (II). (Adaptado de Riley, 1996).

2.2.1 Farmacocinética, Metabolismo e Toxicidade

A isoniazida é rapidamente absorvida após administração oral ou parenteral e se difunde para todos os fluidos corporais, inclusive para o líquido cefalorraquidiano e para todos os compartimentos intracelulares. O pico de concentrações de 3 a 8 mg/L surge no sangue entre 1-2 horas depois da ingestão de 300mg da droga. A meia-vida plasmática varia de 1 a 6 horas, o que depende da sua taxa de acetilação, que está relacionada com diferenças genéticas na atividade do sistema polimórfico enzimático da N-acetiltransferase 2 (NAT2) do hospedeiro, codificada pelo gene *NAT2*. *NAT2* é encontrada predominantemente no fígado e no intestino delgado, locais em que a isoniazida é metabolizada. O fármaco e seus metabólitos são excretados na urina dentro de 24 horas (EVANS, MANLEY e MC, 1960; WEBER e HEIN, 1979; HOLDINESS, 1984; RILEY, 1996; PALOMINO *et al.*, 2007).

Primeiro, a N-acetiltransferase 2 acetila a isoniazida produzindo acetilisoniazida; este produto é hidrolisado a ácido isonicotínico e monoacetilhidrazina (tóxica), que é acetilada a diacetilhidrazina (Figura 2). Nenhum desses metabólitos derivados da

INH tem qualquer atividade anti-TB (HOLDINESS, 1984; RILEY, 1996; PALOMINO *et al.*, 2007).

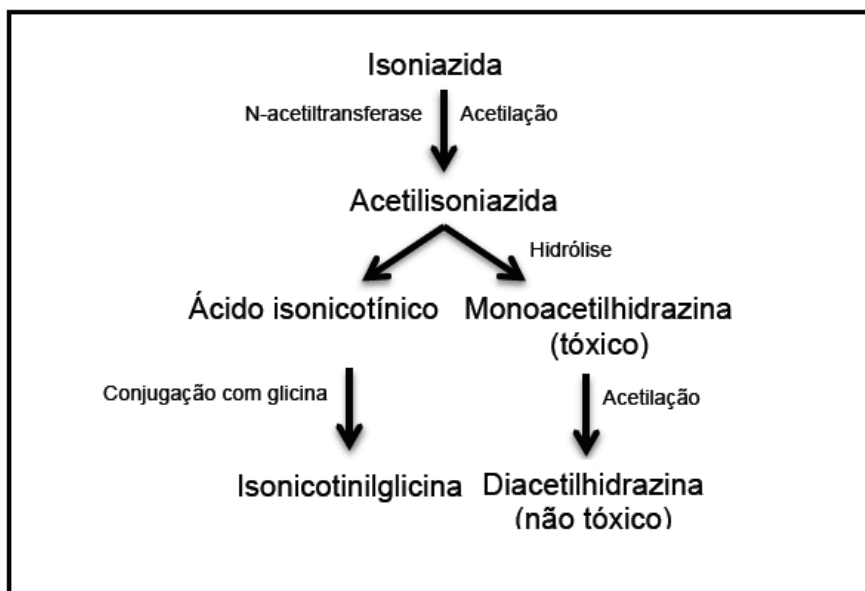


Figura 2. Via de N-acetilação da INH.

De 10 a 20% dos pacientes podem desenvolver aumento transitório de enzimas hepáticas no início do tratamento e algumas vezes desenvolver danos hepáticos. Nesses casos, a administração de INH deve ser interrompida. A hepatotoxicidade está associada com a presença de grupos hidrazida que foram apenas parcialmente acetilados o que gera um produto intermediário produzido pela N-hidroxilação de monoacetilhidrazina, um dos metabólitos da droga (BERNSTEIN *et al.*, 1952; JENNEY e PFEIFFER, 1958; TIMBRELL *et al.*, 1980; HOLDINESS, 1984; PALOMINO *et al.*, 2007). A INH e a monoacetilhidrazina competem pelas vias de acetilação e este último causa hepatotoxicidade (PERETTI, KARLAGANIS e LAUTERBURG, 1987).

A função hepática deve ser monitorada antes e durante o tratamento, principalmente em pacientes com histórico de disfunção renal ou hepática, cujas doses devem ser reduzidas para prevenir mais danos. Efeitos adversos neurológicos e hematológicos e reações de hipersensibilidade ocorrem menos frequentemente (PALOMINO, LEAO e RITACCO, 2007).

2.2.2 Mecanismo de Ação

Atualmente propõe-se que a INH atue indiscriminadamente em vários alvos e o mecanismo bactericida permanece controverso (SLAYDEN e BARRY, 2000).

A isoniazida é um pró-fármaco que requer a enzima catalase-peroxidase (codificada pelo gene *katG*) da célula micobacteriana para sua ativação antes de exercer sua atividade terapêutica (BODIGUEL *et al.*, 2001). Sua forma ativa inibe a biossíntese dos ácidos micólicos, que são componentes essenciais da parede celular micobacteriana atingindo vários alvos na parede celular, incluindo a enzima enoil ACP redutase (InhA) e a β -cetoacil ACP sintase (KasA) (ROZWARSKI *et al.*, 1998). A INH é bactericida contra bacilos metabolicamente ativos e bacteriostática contra os bacilos em repouso (ZHANG *et al.*, 1992; SLAYDEN e BARRY, 2000; SANDY *et al.*, 2005; PALOMINO *et al.*, 2007).

Além disso, o bacilo *M. tuberculosis* expressa o gene *nat* que codifica a enzima N-acetiltransferase (NAT). Sabe-se que essa enzima metaboliza a INH em organismos em crescimento. É provável que NAT compita com a enzima KatG pela INH (figura 3), inativando o fármaco para que não exerça seu efeito bactericida (PAYTON *et al.*, 1999; UPTON *et al.*, 2001).

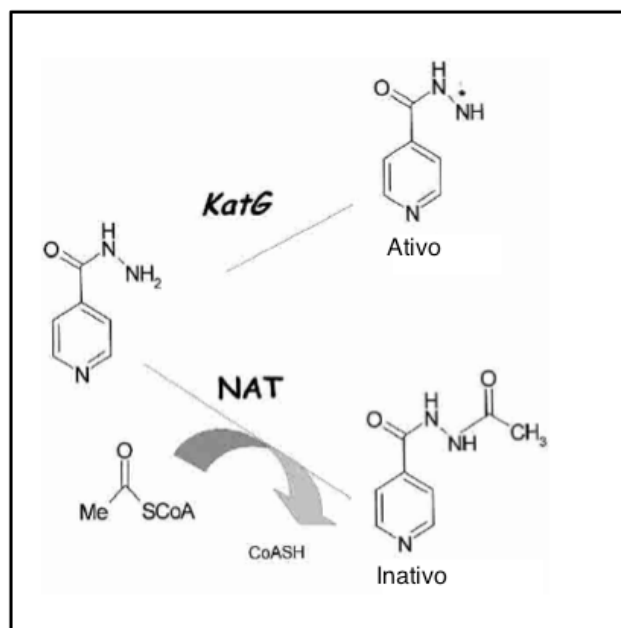


Figura 3. Esquema que mostra a ativação e inativação da INH dentro da célula micobacteriana. INH é um pró-fármaco e requer a ativação pela catalase-peroxidase (gene *KatG*). A enzima NAT pode acetilar a INH, o que resulta em inatividade terapêutica (Adaptado de Bodiguel *et al*, 2001).

Ainda, quando ativada, a INH produz espécies extremamente reativas que potencialmente possuem a capacidade de impedir muitos processos celulares. De fato, muitos efeitos pleiotrópicos tais como a inibição da síntese de macromoléculas, especialmente de proteínas e ácidos nucleicos, são observados (TSUKAMURA e TSUKAMURA, 1963; MCCLATCHY, 1971).

Dentre os principais efeitos com o uso de INH, podem ser observadas mudanças na ultraestrutura bacteriana por microscopia eletrônica (TAKAYAMA, WANG e MERKAL, 1973). A viscosidade do proteoplasma começa a aumentar o que sugere que a síntese proteica ocorre normalmente e o volume da célula continua o mesmo (TAKAYAMA, KEITH e SNIPES, 1975a). Evidências sugerem que o mecanismo de ação da INH esteja relacionado com a integridade da parede celular ao se basear nas seguintes observações: perda de resistência ao ácido, facilidade com que moléculas de alto peso molecular podem se extravasar de células tratadas com INH e diminuição da natureza hidrofóbica das células que coincidem com uma rápida diminuição de ácidos micólicos da fração de lipídeos ligantes (WINDER, COLLINS e ROONEY, 1970; WINDER e ROONEY, 1970).

Para Takayama e colaboradores, estudos dos efeitos bioquímicos da INH na síntese do ácido micólico em *M. tuberculosis* mostraram que existe uma perfeita correlação entre viabilidade e inibição da síntese do ácido micólico. Além disso, a habilidade para reverter os efeitos na produção do ácido micólico e a habilidade do microrganismo de se recuperar dos efeitos da droga são coincidentes (TAKAYAMA, WANG e DAVID, 1972; TAKAYAMA, ARMSTRONG e DAVID, 1974).

A concentração inibitória mínima (CIM) da isoniazida varia de 0,02 a 0,2mg/L (PALOMINO *et al.*, 2007). Na CIM, o fármaco induz o acúmulo de ácidos graxos saturados com 24 a 26 carbonos e inibe a produção de ácidos maiores do que estes, incluindo o ácido micólico. Sugere-se, a partir desta evidência, que ocorra a dessaturação do ácido tetracosanóico (TAKAYAMA *et al.*, 1975b; DAVIDSON e TAKAYAMA, 1979).

Existem também evidências de que a INH induz a expressão de genes envolvidos na produção da parede celular tais como o complexo do antígeno 85 que tem a função de transferir os ácidos micólicos para os arabinogalactanos adjacentes (GARBE, HIBLER e DERETIC, 1996; BELISLE *et al.*, 1997).

2.2.3 Farmacogenética e Isoniazida

Após 50 décadas de pesquisas farmacogenéticas, sabe-se, hoje, que diferenças genéticas entre indivíduos podem explicar variabilidades observadas na farmacocinética, eficácia e toxicidade de algumas drogas (KIRCHHEINER, FUHR e BROCKMOLLER, 2005).

A farmacogenética é uma área de estudo muito promissora, principalmente por ter um impacto importante nas doenças infecciosas negligenciadas de países em desenvolvimento, como malária, tuberculose e HIV/AIDS (PANG, 2003). Ela é definida como o estudo de variações genéticas que causam respostas variáveis a fármacos e inclui o estudo de polimorfismos genéticos de transportadores de fármacos, enzimas que metabolizam fármacos e receptores de fármacos (ALTMAN e KLEIN, 2002; SEVERINO e DEL ZOMPO, 2004). É importante destacar que essa

variabilidade na resposta individual a um medicamento é influenciada, em parte, por fatores como sexo, idade, peso, função renal e hepática, coadministração de medicamentos, heterogeneidade da doença, estado nutricional ou fumo (TOMALIK-SCHARTE *et al.*, 2008).

Assim que a sequência do genoma humano tornou-se disponível, muitas variações genéticas foram detectadas, como os polimorfismos e as mutações. Grande parte dos polimorfismos ocorre em bases únicas e são denominados Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), que são diferenças entre cromossomos em uma base nucleotídica presente em um local específico na sequência do DNA (mutações pontuais) e devem estar presentes na população em taxas maiores ou iguais a 1% (The International HapMap Project, 2003; A haplotype map of the human genome, 2005; REDON *et al.*, 2006; SIM *et al.*, 2008). Estima-se que cerca de 10 milhões de SNPs comuns existam (em média, um a cada 300 bases), constituindo 90% da variação na população mundial. Os 10% restantes são devido a uma gama de variantes raras na população. A presença de SNPs particulares em um indivíduo é determinada por meio da genotipagem da amostra de DNA genômico (The International HapMap Project, 2003; REICH, GABRIEL e ALTSHULER, 2003).

Uma combinação específica de alterações genéticas observadas ao longo de um cromossomo é conhecida como haplótipo. Novos haplótipos são formados por mutações adicionais ou pela recombinação quando cromossomos maternos e paternos trocam segmentos correspondentes do DNA, o que resulta em um cromossomo que é uma combinação dos dois haplótipos, o paterno e o materno, ou seja, cada combinação de SNPs constitui um haplótipo distinto que é reconhecido como um alelo do sistema de haplótipos (Figura 4) (XU *et al.*, 2002; The International HapMap Project, 2003; PAABO, 2003; SABBAGH e DARLU, 2005).

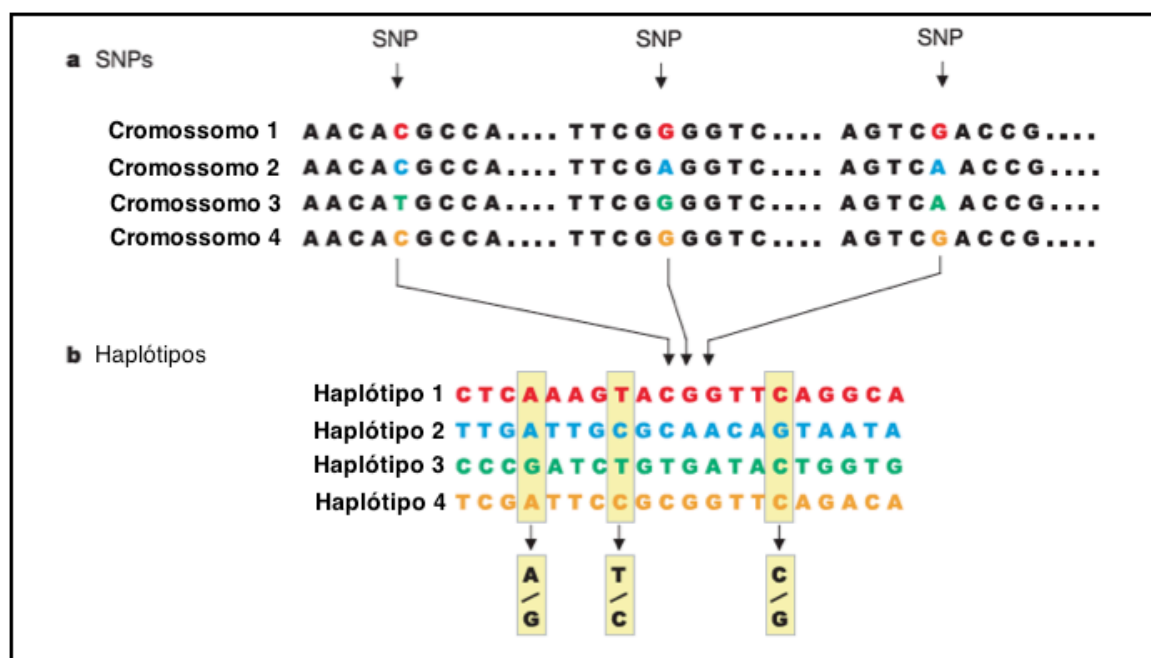


Figura 4. a, SNPs. Mostra um pedaço da fita de DNA de quatro versões da mesma região do cromossomo em pessoas diferentes. A maioria da sequência do DNA é idêntica nesses cromossomos, porém em três bases ocorrem variações. Cada SNP tem dois possíveis alelos; o primeiro SNP no painel **a** tem os alelos C e T. **b, Haplótipos.** Um haplótipo é composto de uma combinação particular de SNPs próximos. Apenas as bases que variam são mostradas, incluindo os três SNPs que aparecem no painel **a**. (Adaptado de The International HapMap Project, 2003).

Variantes que levam a deficiências da atividade enzimática bem como aquelas que reduzem ou aumentam a atividade quando comparadas com alelos tipo selvagem já estão descritas, como é o caso da enzima humana que metaboliza a INH, conhecida como N-acetiltransferase 2 (NAT2) (TOMALIK-SCHARTE *et al.*, 2008). Logo que a INH começou a ser utilizada no tratamento da TB, a partir do ano de 1953, uma ampla variação no seu metabolismo foi encontrada em humanos (BONICKE e REIF, 1953; HUGHES, 1953; HUGHES *et al.*, 1954).

Estudos iniciais de farmacocinética para INH mostraram que o fármaco é eliminado de forma bimodal (EVANS *et al.*, 1960). Ainda, segundo Mandell e colaboradores (1996), os acetiladores intermediários e rápidos constituíam um único grupo classificado como rápido, o que caracterizou uma distribuição bimodal de acetiladores: os acetiladores lentos e os acetiladores rápidos.

Porém, técnicas de biologia molecular moderna e métodos analíticos aprimorados estabeleceram, sem dúvidas, que a eliminação da INH segue um modelo trimodal que classifica os indivíduos em três genótipos: homozigotos lentos (SS - apresentam

dois alelos mutantes com baixa atividade), heterozigotos intermediários (FS – apresentam um alelo mutante e um selvagem) e homozigotos rápidos (FF – apresentam dois alelos funcionais) . Assim, os parâmetros farmacocinéticos de acetilação são definidos como acetiladores lentos, intermediários e rápidos (figura 5) (SUNAHARA, URANOM e OGAWAM, 1961; DEGUCHI, MASHIMO e SUZUKI, 1990; PARKIN *et al.*, 1997; SEIFART *et al.*, 2001; SABBAGH e DARLU, 2005).

O polimorfismo genético na atividade de NAT2 é um dos mais comuns nos indivíduos com variedade fenotípica e variação alélica dentro de populações humanas, o que leva a variações interindividuais na capacidade de acetilação da INH (CASCORBI *et al.*, 1995; GRANT *et al.*, 1997; KITA *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006). Ainda, segundo Gumbo e colaboradores (2007), populações étnicas distintas apresentam distribuições diferentes de perfis fenotípicos de acetilação. Portanto a eficácia total da dose de INH recomendada pode ser diferente em grupos étnicos distintos.

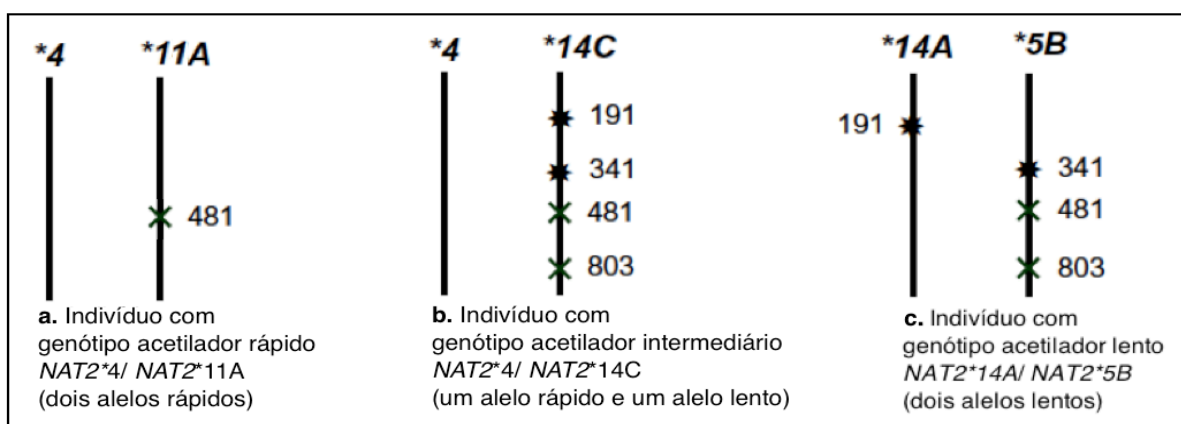


Figura 5. Exemplo de haplótipos. O símbolo (*) representa mutações defeitivas e o símbolo (X) representa mutações funcionais. (Adaptado de Sabbagh e Darlu, 2005).

Em humanos, as reações de acetilação são catalisadas pela NAT presente no citosol, que apresenta duas isoformas, a N-acetiltransferase 1 (NAT1) e a N-acetiltransferase 2 (NAT2) (UPTON *et al.*, 2001). As NATs foram as primeiras enzimas polimórficas metabolizadoras de xenobióticos identificadas em humanos e catalisam a conjugação do grupo acetil do acetil-CoA para uma amina, hidrazina ou hidroxilamina de componentes aromáticos (EVANS *et al.*, 1960; UPTON *et al.*, 2001). Pelo fato da NAT2 ser responsável pela ativação e desativação de aminas

aromáticas e heterocíclicas de importância clínica e fármacos hidrazinas, é de grande interesse de saúde pública entender a base molecular dos seus polimorfismos (FRET LAND *et al.*, 2001).

Os genes *NAT* humanos estão localizados no cromossomo 8p22 dentro de uma região de 140-360 kb, que é uma região instável e geralmente deletada em células tumorais, o que sugere a presença de genes supressores de tumor neste local (MATAS *et al.*, 1997; THYGESEN *et al.*, 1999; SIM *et al.*, 2000). Existem 3 *loci*: *NAT1* e *NAT2*, que são genes funcionais e *NATP*, que é um pseudogene. *NAT2* humano apresenta mRNA composto pelo éxon codificador da proteína e outro éxon de 100 pb localizado a 8kb senso (5' UTR) do códon de iniciação (BLUM *et al.*, 1990; UPTON *et al.*, 2001). As variantes alélicas de *NAT2* possuem uma ou mais combinações de SNPs na região codificante de 873pb e não apresentam íntrons (Figura 6) (VATSIS, MARTELL e WEBER, 1991; SABBAGH e DARLU, 2005; HEIN e DOLL, 2012).

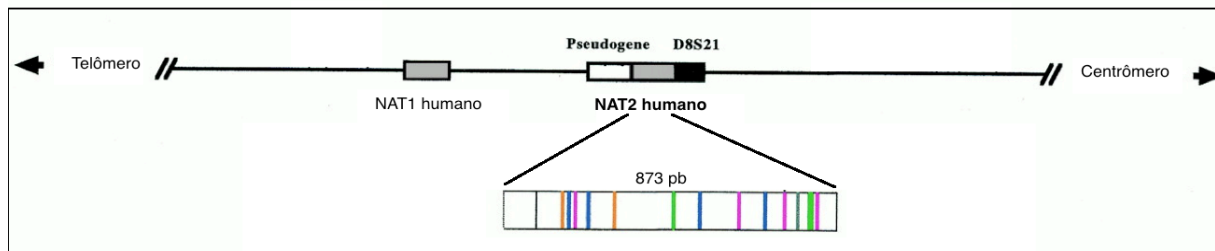


Figura 6. Representação esquemática do cromossomo 8p22 mostrando a região de *NAT2*. (Adaptado de Sim *et al.*, 2000).

Estes polimorfismos no gene *NAT2* possuem grande importância por estarem relacionados tanto com a resposta terapêutica da INH quanto com a toxicidade de regimes antimicobacterianos que contém o fármaco (DICKINSON *et al.*, 1981; ELLARD, 1984). Os sete polimorfismos mais frequentemente encontrados na região codificante do gene *NAT2* são 191G>A, 282C>T, 341T>C, 481C>T, 590G>A, 803A>G e 857G>A (HEIN e DOLL, 2012). Quatro deles (nas posições 191, 341, 590 e 857) resultam em uma substituição de aminoácidos que levam a uma diminuição significativa na capacidade de acetilação. Os outros 3 são mutações silenciosas (282C>T, 481C>T) ou substituição não-sinônima que não altera o fenótipo (803A>G) (SABBAGH e DARLU, 2005).

Em um estudo realizado por Weber e colaboradores (1983), verificou-se que após uma dose oral de 300mg de INH, os acetiladores rápidos excretaram 23% da droga como diacetilhidrazina e os acetiladores lentos excretaram apenas 5% deste metabólito. Consequentemente, associou-se o perfil fenotípico com aumento de hepatotoxicidade induzido pela droga.

Os pacientes acetiladores lentos, ou seja, portadores de dois alelos defectivos, desenvolvem hepatotoxicidade mais frequentemente do que os acetiladores rápidos, pacientes com os dois alelos funcionais, durante o tratamento para TB com o regime padronizado (OHNO *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2011; AZUMA *et al.*, 2012). Em contraste, os acetiladores rápidos estão mais propensos a falência terapêutica provavelmente devido à exposição insuficiente a INH (Figura 7) (PARKIN *et al.*, 1997; DONALD *et al.*, 2004; AZUMA *et al.*, 2012).

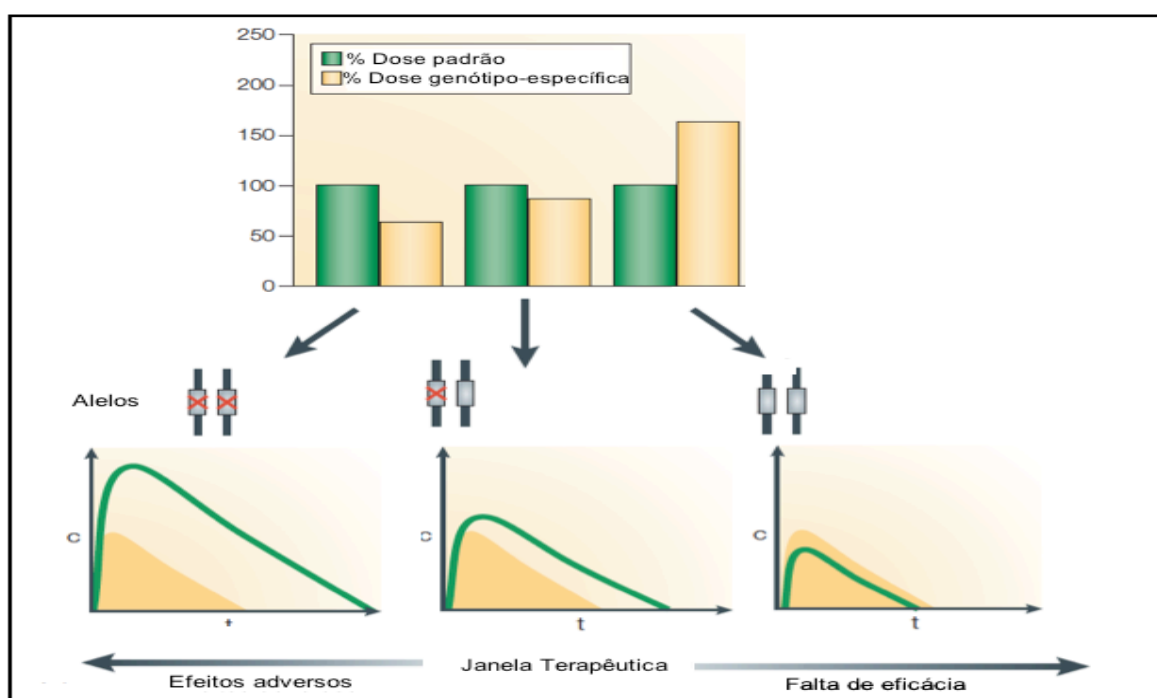


Figura 7. Esquema que mostra o benefício de ajuste de dose baseado no genótipo. Indivíduos que apresentam baixa atividade metabolizadora de drogas apresentam maior probabilidade de desenvolverem efeitos adversos. Em contrapartida, indivíduos que metabolizam rapidamente têm maior tendência a apresentarem falha terapêutica. c: concentração da droga; t: tempo. (Adaptado de Kirchheiner *et al.*; 2005).

Estas observações implicam que a dosagem atual de INH recomendada internacionalmente é muito alta para os acetiladores lentos e insuficiente para os acetiladores rápidos. Assim, poderia se assumir que o tratamento estratificado de

acordo com a farmacogenética tem o potencial de evitar desfechos desfavoráveis com aumento significativo da taxa de cura (AZUMA *et al.*, 2012).

Ainda, devido a alta frequência e importância no polimorfismo de *NAT2* na susceptibilidade a toxicidade a fármacos e/ou vários cânceres, estudos são necessários para caracterizar o efeito dos SNPs na função de *NAT2* (FRET LAND *et al.*, 2001).

Segundo o consenso de nomenclatura do gene *NAT2* humano, da Universidade de Louisville, atualizado em 22 de julho de 2011, o alelo de referência *NAT2**4 (associado com fenótipo acetilador rápido), 25 SNPs distintos e 65 variantes alélicas já estão identificados na população humana (Tabela 2) (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/consensus-human-arylamine-n-acetyltransferase-gene-nomenclature/nat_pdf_files/Human_NAT2_alleles.pdf>).

Tabela 2. Alelos *NAT2* humanos. A mutação que caracteriza cada grupo está em letra vermelha.

Alelo <i>NAT2</i>	SNPs	Fenótipo
<i>NAT2</i> *4	Tipo selvagem	Rápido
<i>NAT2</i> *5A	341T>C, 481C>T	Lento
<i>NAT2</i> *5B	341T>C, 481C>T, 803A>G	Lento
<i>NAT2</i> *5C	341T>C, 803A>G	Lento
<i>NAT2</i> *5D	341T>C	Lento
<i>NAT2</i> *5E	341T>C, 590G>A	Lento
<i>NAT2</i> *5F	341T>C, 481C>T, 759C>T, 803A>G	Lento
<i>NAT2</i> *5G	282C>T, 341T>C, 481C>T, 803A>G	Lento
<i>NAT2</i> *5H	341T>C, 481C>T, 803A>G, 859Del	Lento
<i>NAT2</i> *5I	341T>C, 411A>T, 481C>T, 803A>G	Lento
<i>NAT2</i> *5J	282C>T, 341T>C, 590G>A	Lento
<i>NAT2</i> *5K	282C>T, 341T>C	-
<i>NAT2</i> *5L	70T>A, 341T>C, 481C>T, 803A>G	-
<i>NAT2</i> *5M	341T>C, 481C>T, 803A>G, 838G>A	-
<i>NAT2</i> *5N	341T>C, 472A>C, 481C>T, 803A>G	-
<i>NAT2</i> *5O	203G>A, 341T>C, 481C>T, 803A>G	-
<i>NAT2</i> *5P	282C>T, 341T>C, 481C>T, 578C>T, 590G>A, 803A>G	-
<i>NAT2</i> *6A	282C>T, 590G>A	Lento
<i>NAT2</i> *6B	590G>A	Lento
<i>NAT2</i> *6C	282C>T, 590G>A, 803A>G	Lento
<i>NAT2</i> *6D	111T>C, 282C>T, 590G>A	Lento
<i>NAT2</i> *6E	481C>T, 590G>A	Lento
<i>NAT2</i> *6F	590G>A, 803A>G	-
<i>NAT2</i> *6G	282C>T, 518A>G, 590G>A	-
<i>NAT2</i> *6H	282C>T, 590G>A, 766A>G	-
<i>NAT2</i> *6I	282C>T, 590G>A, 838G>A, 857G>A	-
<i>NAT2</i> *6J	282C>T, 590G>A, 857G>A	-
<i>NAT2</i> *6K	282C>T, 590G>A, 638C>T	-
<i>NAT2</i> *6L	282C>T, 345C>T, 590G>A	-

Tabela 2. Alelos *NAT2* humanos. A mutação que caracteriza cada grupo está em letra vermelha.
(continuação)

Alelo <i>NAT2</i>	SNPs	Fenótipo
<i>NAT2*6M</i>	152G>T, 282C>T, 590G>A	-
<i>NAT2*6N</i>	282C>T, 481C>T, 590G>A	-
<i>NAT2*6O</i>	282C>T, 481C>T, 838G>A	-
<i>NAT2*7A</i>	857G>A	Lento
<i>NAT2*7B</i>	282C>T, 857G>A	Lento
<i>NAT2*7C</i>	282C>T, 803A>G, 857G>A	-
<i>NAT2*7D</i>	191G>A, 282C>T, 857G>A	-
<i>NAT2*7E</i>	282C>T, 481C>T, 857G>A	-
<i>NAT2*10</i>	499G>A	Lento
<i>NAT2*11A</i>	481C>T	Rápido
<i>NAT2*11B</i>	481C>T , 859Del	Desconhecido
<i>NAT2*12A</i>	803A>G	Rápido
<i>NAT2*12B</i>	282C>T, 803A>G	Rápido
<i>NAT2*12C</i>	481C>T, 803A>G	Rápido
<i>NAT2*12D</i>	364G>A, 803A>G	Lento
<i>NAT2*12E</i>	282C>T, 578C>T, 803A>G	-
<i>NAT2*12F</i>	622T>C, 803A>G	-
<i>NAT2*12G</i>	609G>T, 803A>G	-
<i>NAT2*12H</i>	403G>C, 803A>G	-
<i>NAT2*12I</i>	228C>T, 803A>G	-
<i>NAT2*12J</i>	29C>T, 803A>G	-
<i>NAT2*13A</i>	282C>T	Rápido
<i>NAT2*13B</i>	282C>T , 578C>T	-
<i>NAT2*14A</i>	191G>A	Lento
<i>NAT2*14B</i>	191G>A , 282C>T	Lento
<i>NAT2*14C</i>	191G>A , 341T>C, 481C>T, 803A>G	Lento
<i>NAT2*14D</i>	191G>A , 282C>T, 590G>A	Lento
<i>NAT2*14E</i>	191G>A , 803A>G	Lento
<i>NAT2*14F</i>	191G>A , 341T>C, 803A>G	Lento
<i>NAT2*14G</i>	191G>A , 282C>T, 803A>G	Lento
<i>NAT2*14H</i>	191G>A , 282C>T, 683C>T	-
<i>NAT2*14I</i>	191G>A , 481C>T, 803A>G	-
<i>NAT2*17</i>	434A>C	Lento
<i>NAT2*18</i>	845A>C	Rápido
<i>NAT2*19</i>	190C>T	Lento
<i>NAT2*20</i>	600A>G	-
<i>NAT2*21</i>	458C>T	-

2.3 Justificativa

Sabe-se que o esquema básico para tratamento de TB no Brasil é composto pelos quatro fármacos - isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Já nos primeiros

dias de tratamento, ocorre uma redução significativa da carga bacteriana em função da atividade da rifampicina e da isoniazida, sendo que esta última é a principal responsável pela atividade bactericida precoce nos dois primeiros dias da terapia em comparação com a ABP da rifampicina como descrito (JINDANI *et al.*, 1980; SIRGEL *et al.*, 1993; DONALD *et al.*, 1997; SIRGEL *et al.*, 2000), ao passo que a pirazinamida e o etambutol possuem ação esterilizante mais tardia. Assim, a isoniazida é o fármaco essencial no tratamento da TB, devido à sua potente atividade bactericida precoce.

A variação interindividual nas concentrações sistêmicas de INH devido a polimorfismos genéticos tem o potencial de influenciar tanto a resposta terapêutica quanto a toxicidade para um paciente em regime que contém INH (DICKINSON *et al.*, 1981; ELLARD, 1984). A genotipagem de *NAT2* ou a análise dos níveis séricos de INH 6 horas após a ingestão, pode predizer a classificação do perfil de acetilação. Isso sugere a possibilidade que esta análise possa ser feita antes do início da medicação em pacientes de alto risco ao tratamento anti-tuberculose (RANA *et al.*, 2011). Em acetiladores rápidos, as concentrações séricas de INH são menores do que em acetiladores lentos e sua eficácia terapêutica pode não ser alcançada (EVANS *et al.*, 1960).

Além do perfil acetilador do indivíduo, alguns estudos epidemiológicos mostram que o tempo de conversão do exame direto e/ou da cultura pode ser variável, com até 27,2% dos doentes apresentando resultados de cultura positiva com crescimento bacteriano de *M. tuberculosis* após 2 meses de tratamento, além de mostrarem uma relação direta com a carga bacilar elevada (GOPI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2009; CAETANO MOTA *et al.*, 2012).

Com base neste fato, poder-se-ia especular que o tempo de negativação da carga bacilar do escarro estaria relacionado com o perfil genotípico de acetilação do paciente e com a carga bacilar antes do início do tratamento, ou seja, os acetiladores lentos apresentariam menor tempo de negativação se comparados com os acetiladores rápidos e aqueles que apresentassem carga bacilar elevada demorariam mais tempo para conversão da cultura.

Embora lógica, esta hipótese ainda não foi sustentada com base em ensaios clínico-laboratoriais, o que torna necessário a realização de estudos para um melhor entendimento desta questão.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente o perfil de acetilação da isoniazida em pacientes com tuberculose pulmonar e analisar o seu papel no processo de redução ou eliminação da carga bacilar no escarro.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar a possibilidade de extração, amplificação e purificação de DNA genômico para o sequenciamento do gene *NAT2* a partir de amostras de escarro congeladas.
- b) Caracterizar geneticamente o gene *NAT2* em amostras de sangue e/ou escarro e, assim, determinar o perfil de acetilação de pacientes com tuberculose pulmonar.
- c) Avaliar a possível associação entre o perfil genotípico de acetilação da isoniazida e o tempo de negatificação da cultura de escarro de pacientes em vigência de tratamento para tuberculose.
- d) Avaliar a possível associação entre a carga bacilar e o tempo de negatificação da cultura de escarro de pacientes em vigência de tratamento para tuberculose.
- e) Avaliar a possível associação entre a gravidade da doença e o tempo de negatificação da cultura de escarro de pacientes em vigência de tratamento para tuberculose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o número de registro CEP – 288.963. Título: “Estudo sobre a acetilação da isoniazida em pacientes com tuberculose pulmonar e da sua implicação na redução ou eliminação da carga bacilar no escarro”.

4.2 Estratégia do Estudo

4.2.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo do tipo descritivo transversal analítico, o qual utilizou sangue e/ou escarro de pacientes com tuberculose para genotipagem de polimorfismos no gene *NAT2*.

4.2.2 Local do Estudo

Este estudo foi realizado no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Espírito Santo, em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias do Departamento de Micobacterioses – Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, onde a parte experimental de farmacogenética e análise dos resultados foi executada (extração do DNA genômico, amplificação das regiões de interesse do gene *NAT2*, purificação dos fragmentos amplificados, sequenciamento).

4.3 Caracterização dos Pacientes

A população do estudo foi composta por 70 pacientes dentre aqueles que participaram de ensaios clínicos prévios realizados no HUCAM e que atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos, como mostrado a seguir:

- 10 pacientes do “Estudo fase I, aberto, randomizado, para avaliação da atividade bactericida precoce de múltiplas doses da Linezolida, Gatifloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina em pacientes adultos não infectados pelo HIV com tuberculose pulmonar bacilífera e sem tratamento prévio para a doença”. Registro CONEP: 7917.
- 38 pacientes do “Estudo prospectivo, multicêntrico, controlado, randomizado, para a avaliação de esquema encurtado do tratamento padrão da tuberculose de 6 meses para 4 meses, em pacientes HIV negativos, infectados com cepas sensíveis às drogas, sem doença cavitária e com cultura negativa no segundo mês de tratamento”. Registro CONEP: 3319.
- 22 pacientes do estudo: “Análise do potencial preditivo e marcadores imunológicos e microbiológicos na avaliação da resposta terapêutica anti-tuberculose em pacientes adultos HIV negativos com baciloscopia positiva e baciloscopia negativa para tuberculose pulmonar”. Registro CONEP: 1491.

4.3.1 Critérios de Inclusão

Para inclusão no protocolo de estudo considerou-se os seguintes itens:

- Pacientes que tenham participado previamente dos estudos citados no item 4.2;
- Ambos os sexos e idade entre 18 e 65 anos;
- Que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3.2 Critérios de Exclusão

Para exclusão do protocolo de estudo considerou-se o seguinte item:

- Incapacidade de localização do paciente.
- Incapacidade de assinatura do TCLE

4.4 Amostra Clínica

4.4.1 Escarro

Utilizou-se amostras de escarro previamente armazenadas no banco de escarros em freezer a -70°C do NDI-UFES, referentes aos pacientes dos três estudos citados no item 4.2.

4.4.2 Sangue Total

Coletou-se 3mL de sangue em tubo *vacutainer* contendo anticoagulante (citrato de sódio ou EDTA). A coleta foi realizada pelo pesquisador e por um enfermeiro treinados para execução do procedimento para assegurar o bem-estar do paciente e a qualidade da amostra.

4.5 Caracterização do Tempo de Negativação da Cultura de Escarro

As amostras de escarro, dos pacientes dos estudos citados no item 4.3, foram processadas com NALC/ citrato de sódio e descontaminadas com hidróxido de sódio. Reconstituiu-se o sedimento com tampão fosfato e o inoculou em meio de cultura sólido (Lowenstein-Jensen) e meio de cultura líquido BACTEC™ 460 TB System *Mycobacterial Culture Media* (Becton Dickinson, Sparks, MD). Observou-se as culturas em meio sólido semanalmente para verificação de crescimento bacteriano até a 6ª semana. Para a cultura no BACTEC, definiu-se como positivo um

crescimento acima de 75 GU (Unidades de Crescimento) (VON GROLL *et al.*, 2010). Todos os isolados dos pacientes foram identificados como *M. tuberculosis* com base nas características fenotípicas das colônias (rugosas, creme e opacas), na sensibilidade ao p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP) e/ou ao ácido p-nitrobenzóico e na resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (DIETZE *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2006; PALACI *et al.*, 2007).

A partir da análise retrospectiva dos dados microbiológicos de cada paciente, verificou-se o tempo, para confirmação da conversão das culturas positivas de escarro, que foi definido como a data de início do tratamento até a data de coleta do primeiro escarro com cultura negativa, ou seja, ausência de crescimento em cultura de micobactérias (tempo de negatização). Classificou-se a variável “tempo” em três categorias: mês 1, mês 2 e mês 3.

4.6 Caracterização dos Pacientes de Acordo com a Carga Bacilar Presente no Escarro

A cultura quantitativa, nos estudos citados no item 4.3, foi realizada digerindo-se as amostras de escarro com NALC/citrato de sódio ou com dithiothreitol (DTT). Preparou-se diluições seriadas da ordem de 10 vezes e semeou-se separadamente duas amostras com 30 μ L em ágar Middlebrook 7H10 seletivo (contendo anfotericina, polimixina B, carbenicilina, trimetoprim) e ágar 7H10 seletivo plus (concentração dobrada de antibióticos). Incubou-se as placas inoculadas a 37°C com CO₂ e as examinou nos dias 3, 14, 21, 30 e 42 (JOHNSON *et al.*, 2006).

Classificou-se a variável “carga bacilar” em 2 categorias: o grupo de pacientes com carga bacilar < 4 log de unidades formadora de colônia (UFC) (baixa carga bacilar) e o grupo de pacientes com carga bacilar $\geq$ 4 log de UFC (alta carga bacilar) (PALACI *et al.*, 2007).

4.7 Caracterização dos Genótipos de Acetilação

4.7.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi isolado de 200µL da amostra congelada (sangue total e/ou escarro) utilizando o *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Inc., USA), como se segue: adicionou-se a amostra a 20µL de proteinase K e 200µL de *Buffer AL*. Levou-se a mistura ao *vortex*, durante 15 segundos, e incubou-se a 56°C, durante 10 minutos. A seguir, adicionou-se 200µL de etanol (96-100%) e levou-se ao *vortex*, por mais 15 segundos. Transferiu-se a mistura para a coluna cromatográfica, centrifugou-se a 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto, descartou-se o filtrado, adicionou-se 500µL de *Buffer AW1* e centrifugou-se a 8000 rpm (6000 x g), por mais 1 minuto. Descartou-se o filtrado e adicionou-se 500µL de *Buffer AW2*, centrifugou-se a 14000 rpm (20000 x g) por 3 minutos e, novamente, descartou-se o filtrado. Adicionou-se 100µL de *Buffer* de eluição AE, incubou-se em temperatura ambiente (15 a 25°C) por 1 minuto e centrifugou-se a 8000 rpm (6000 x g), por 1 minuto, em um tubo para coleta do líquido eluído. Após a extração, as amostras de DNA foram estocadas a -20°C.

4.7.2 Confirmação da extração do DNA genômico

Submeteu-se todos os DNAs genômicos extraídos à eletroforese em gel de agarose 1% e coloração do DNA com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Capturou-se e armazenou-se todas as imagens geradas usando o sistema de fotodocumentação MiniBis Pro: Fotodocumentador para Fluorescência UV e Luz branca (DNR, Bio-Imaging Systems).

4.7.3 Genotipagem do Gene *NAT2*

Realizou-se a genotipagem da região codificante de *NAT2* por meio de técnicas de PCR e sequenciamento automatizado. Para isso, utilizou-se duas estratégias: (i)

amplificação de um fragmento de 1093pb, contendo toda região codificante do gene alvo, ou (ii) amplificação de dois fragmentos (com tamanhos de 560 pb e 685 pb) que juntos formam a região codificante de *NAT2*. Utilizou-se a segunda estratégia para as amostras com DNA genômico altamente fragmentado, onde foi possível a obtenção do fragmento de 1093 pb (Figura 8).

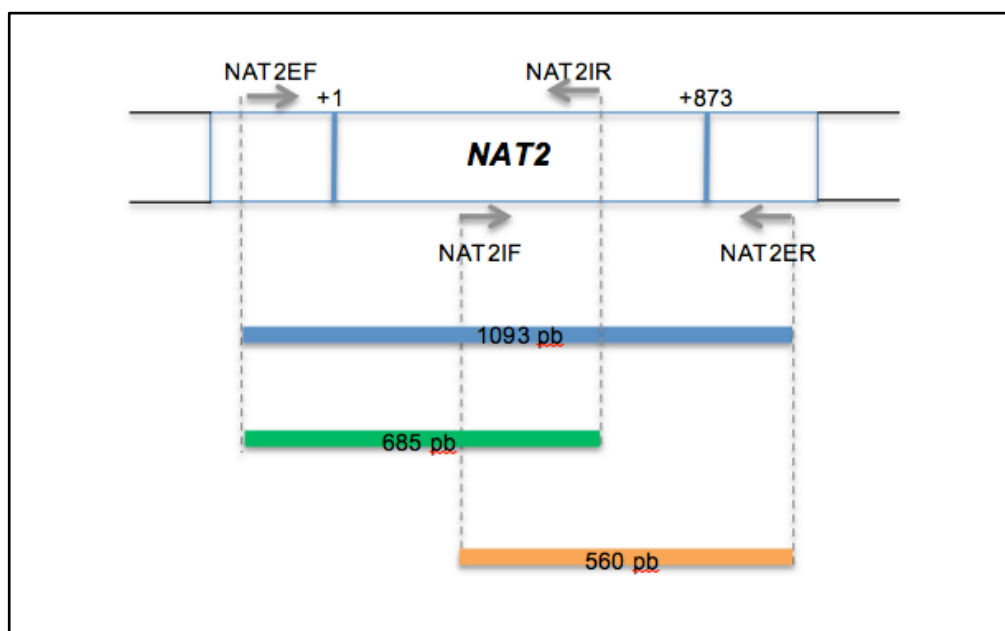


Figura 8. Esquema das amplificações da região codificante de *NAT2* que mostra os três fragmentos gerados para sequenciamento a partir dos iniciadores NAT2EF, NAT2ER, NAT2IF e NAT2IR.

4.7.3.1 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

Realizou-se a reação de PCR para amplificação da região codificante de *NAT2* (*intronless* – 873 pb) segundo Teixeira e colaboradores (2007), utilizando-se os iniciadores NAT2EF e NAT2ER, para geração do fragmento de 1093 pb (Tabela 3). Rapidamente, adicionou-se 100ng de DNA genômico a uma reação que continha 200ng de cada iniciador, 0,2mM de dNTPs, 3,5mM de MgCl₂, tampão da enzima 1X (2mM de tris-HCl pH 9,0 e 10mM de KCl) e 1U de *Taq Gold* polimerase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase - PE Applied BioSystems) em um volume final de 50 µL.

Tabela 3. Sequência dos Iniciadores (Teixeira *et al.*, 2007).

Iniciador	Sequência	Tamanho de amplificação
NAT2EF	5' TTA GTC ACA CGA GGA AAT CAA A 3'	NAT2EF+NAT2ER = 1093 pb
NAT2ER	5' AAA TGC TGA CAT TTT TAT GGA TGA 3'	
NAT2IF	5' ACC ATT GAC GGC AGG AAT TA 3'	NAT2IF+NAT2ER = 685 pb
NAT2IR	5' TGG TCC AGG TAC CAG ATT CC 3'	NAT2EF+NAT2IR = 560 pb

Para amplificação dos produtos, as condições de termociclagem foram: uma desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguidos por uma etapa de PCR *touchdown*, onde, durante os primeiros 20 ciclos, a temperatura de anelamento decrescia em 0,5°C. Nessa etapa, a desnaturação foi realizada a 94°C por 1 minuto, a temperatura de anelamento dos iniciadores foi 67°C→57,5°C, por 1 minuto e a extensão ocorreu a 72°C, por 1 minuto. Após a etapa de *touchdown*, adicionou-se mais 15 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos, o que gerou um produto de 1093 pb (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Para geração do fragmento de 560 pb, a reação de PCR foi a mesma utilizada anteriormente, porém, utilizou-se os iniciadores NAT2EF e NAT2IR (Tabela 3). A termociclagem também seguiu as mesmas condições para amplificação do fragmento de 1093 pb.

Para geração do fragmento de 685 pb, a reação de PCR seguiu as mesmas condições previamente citadas, utilizando-se os iniciadores NAT2IF e NAT2ER (Tabela 3). A termociclagem também seguiu as mesmas condições anteriores.

4.7.3.2 Detecção dos Fragmentos Amplificados de PCR

Submeteu-se todos os produtos de PCR à eletroforese em gel de agarose 1,5% e coloração do DNA com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Capturou-se e armazenou-se todas as imagens geradas usando o sistema de fotodocumentação MiniBis Pro: Fotodocumentador para Fluorescência UV e Luz branca (DNR, Bio-Imaging Systems).

4.7.3.3 Purificação dos Fragmentos a partir do Produto Direto de PCR

Para a purificação dos produtos amplificados utilizou-se o *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen Inc., USA) como se segue: adicionou-se 200 μ L de *Buffer* PB a 40 μ L do produto de PCR e misturou-se. Transferiu-se a mistura para uma coluna cromatográfica e centrifugou-se a 13000 rpm (17900 x g) por 1 minuto. Descartou-se o filtrado e adicionou-se 750 μ L de *Buffer* PE para lavagem da coluna centrifugando-se por mais 1 minuto a 13000 rpm (17900 x g). Para a eluição do DNA, adicionou-se 20 μ L de *Buffer* EB no centro da membrana da coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 13000 rpm (17900 x g), recolhendo assim o líquido eluído (DNA purificado).

4.7.3.4 Purificação dos Fragmentos a partir do Gel Preparatório de Agarose 1,5%

Para amostras que, mesmo após a purificação do produto amplificado em coluna cromatográfica ainda apresentaram bandas inespecíficas, utilizou-se o *Kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen Inc., USA) para purificação do recorte do fragmento específico do gel preparatório de agarose 1,5% com DNA.

Colocou-se o gel com o DNA em uma câmara com luz ultravioleta para recortar, com um bisturi limpo e afiado, fragmentos com bandas de tamanhos específicos (1093 pb, 685 pb e/ou 560 pb). Transferiu-se o fragmento para um tubo de 1,5mL e pesou este fragmento. Adicionou-se 3 volumes de *Buffer* QG a 1 volume de gel (100mg gel $\approx$ 100 μ L). Incubou-se a 50°C por 10 minutos, agitando-se a cada 2 minutos para dissolver o gel. Adicionou-se 1 volume de isopropanol (100%) e misturou-se. Aplicou-se a amostra dissolvida com o gel na coluna cromatográfica e centrifugou-se por 1 minuto a 13000 rpm (10000 x g). Descartou-se o filtrado e adicionou-se 500 μ L de *Buffer* QG à coluna, para centrifugação por mais 1 minuto a 13000 rpm (10000 x g). Novamente descartou-se o filtrado. Para lavagem, adicionou-se 750 μ L de *Buffer* PE e centrifugou-se (1 minuto a 13000 rpm). Colocou-se a coluna cromatográfica em um novo tubo de 1,5mL, adicionou-se 25 μ L de *Buffer* de eluição EB e centrifugou-se por 1 minuto a 13000 rpm (10000 x g) para coleta do DNA eluído.

4.7.3.5 Detecção do DNA Purificado

Submeteu-se as amostras purificadas à eletroforese em gel de agarose 1,5% e coloração do DNA com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Capturou-se e armazenou-se todas as imagens geradas usando o sistema de fotodocumentação MiniBis Pro: Fotodocumentador para Fluorescência UV e Luz branca (DNR, Bio-Imaging Systems).

4.7.3.6 Reação de Sequenciamento

Com a finalidade de identificar os SNPs na região codificante do gene *NAT2*, realizou-se o sequenciamento automatizado pelo método de Sanger e colaboradores (1977), a partir dos produtos de PCR de 1093 pb, 685 pb e 560 pb. Para o fragmento de 1093 pb, utilizou-se dois iniciadores externos (NAT2EF e NAT2ER) e dois iniciadores internos (NAT2IF e NAT2IR), o que totalizou quatro reações, a fim de atingir de forma bem resolvida as extremidades. Para os fragmentos menores, utilizou-se apenas os iniciadores adicionados nas respectivas amplificações.

Para realização das reações de sequenciamento utilizou-se o *Kit ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1* (PE Applied BioSystems) de acordo com as instruções do fabricante com algumas adaptações. Para cada reação de sequenciamento utilizou-se aproximadamente 20ng do produto amplificado, 3,2 pmoles do iniciador, 1,5µL do tampão 5X e 1,0µL do reagente *BigDye*, em um volume final de 10µL completados com água milliQ.

Nesta etapa, é importante destacar que realizou-se todo o processo de preparo da mistura da reação para o sequenciamento, ao abrigo da luz, para que não houvesse excitação do fluoróforo (*BigDye®*) e perda da capacidade de emitir luz quando excitado pelo feixe de luz no sequenciador automático. Sequencialmente, realizou-se a termociclagem com 40 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Manteve-se a placa armazenada a -20°C ou submeteu-se, em seguida, à técnica de precipitação.

4.7.3.6.1 Precipitação da Reação de Sequenciamento

Para precipitação da reação de sequenciamento adicionou-se ao produto da PCR 30µL de isopropanol (75%) e agitou-se vigorosamente no *mixer* por 10 segundos. Incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugou-se a 4000rpm por 45 minutos a 20°C. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 50µL de etanol (75%) ao sedimento. Novamente, centrifugou-se a 4000rpm durante 15 minutos a 20°C e descartou-se o sobrenadante. Realizou-se a secagem do *pellet* em termociclador por 10 minutos a 60°C. Manteve-se a placa a -20°C até o momento do sequenciamento. Antes do sequenciamento, desnaturou-se os DNAs referentes às diferentes amostras com 10µL de formamida (Hi-Di™, Applied Biosystems) e incubou-se a 95°C por 3 minutos, sendo em seguida resfriado (choque térmico).

4.7.3.7 Sequenciamento

Analizou-se as reações no sequenciador de 96 capilares “ABI PRISM® 3730 XL DNA Analyzer” (Applied Biosystems), situado no Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS (http://www.dbbm.fiocruz.br/PDTIS_Genomica/).

4.7.3.8 Análise Computacional das Sequências

Analizou-se as sequências de cada amostra para a identificação de SNPs por meio do *software* SeqScape v.2.5 (Applied BioSystems – <http://www.appliedbiosystems.com>) utilizando como sequência referência o número de acesso no GenBank AY331807 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

Para detecção do par de haplótipo de cada paciente e para definição do respectivo perfil de acetilação, realizou-se a reconstrução haplotípica e a identificação do par de alelos pelo programa PHASE v2.1.1 (STEPHENS e DONNELLY, 2003). Utilizou-se o modelo padrão (*default model*) para a variação da taxa de recombinação (LI e STEPHENS, 2003). Foram realizadas 5 corridas independentes uma da outra, com

os seguintes parâmetros: 1000 interações, 500 interações “burn-in” e “thinning interval” igual a 1. A melhor corrida foi a que mostrou uma consistência máxima, sendo a escolhida entre as 5. Na reconstrução haplotípica, os genótipos que apresentaram uma certeza < 95% foram excluídos do estudo.

4.8 Curvas de Crescimento

Para verificar se o tempo de conversão da cultura de escarro estava relacionado com o tempo de duração da fase lag de crescimento (fase de adaptação metabólica da bactéria ao novo ambiente, na qual o metabolismo celular está direcionado para sintetizar as enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições) dos isolados de *M. tuberculosis* de cada paciente, construiu-se curvas de crescimento de cada cepa, a partir das medidas de densidade óptica (DO) em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 e a partir do BACTEC™ MGIT™ 960 *Mycobacterial Detection System* (Becton Dickinson, Sparks, MD). Realizou-se os dois métodos simultaneamente, em 3 dias consecutivos (triplicata).

4.8.1 Preparo do Cultivo Inicial em Fase Log em Meio de Cultura Líquido Middlebrook 7H9 (T0)

Todos os isolados dos pacientes foram descongelados e inoculados em meio Ogawa a 37°C por exatamente 21 dias. Após esse período, suspendeu-se uma alça bacteriológica cheia de cultura em 4mL de 7H9 com Tween 80 0,05% em um tubo com tampa de rosca com 6 a 10 pérolas de vidro. Agitou-se vigorosamente as suspensões em *vortex* durante 2 minutos e deixou-se em repouso em temperatura ambiente durante 20 minutos para decantação dos grumos de bactérias. A seguir, transferiu-se o sobrenadante (com cuidado para não transferir junto o sedimento) para outro tubo com tampa de rosca e deixou-se em repouso para decantação por mais 15 minutos. Com a suspensão sobrenadante, em um novo tubo com tampa de rosca, adicionou-se 5mL de 7H9 com Tween 80 0,05% e ajustou-se a DO para 0,25 em espectrofotômetro de luz visível a 625nm, o que é equivalente ao padrão 1,0 na escala de McFarland (10^7 UFC/mL). Desta suspensão com DO padronizada, diluiu-

se 500µL em 4,5mL de 7H9 com Tween 80 0,05% em tubo com tampa de rosca (diluição de 1:10 do inóculo). Anotou-se as DOs de todas as suspensões de bactérias diluídas e incubou-se em estufa a 37°C. Diariamente, mediu-se a DO de cada suspensão até que todas alcançassem a DO de 0,25 (o que significa que a bactéria está na fase logarítmica de crescimento) para dar início aos experimentos das curvas de crescimento, definindo assim, as suspensões como T0.

4.8.2 Análise da Curva de Crescimento dos Isolados de *M. tuberculosis* em Meio de Cultura Líquido Middlebrook 7H9

A partir de T0, preparou-se as suspensões para realização da curva de crescimento como se segue. Para cada cepa, agitou-se mecanicamente em *vortex* o tubo T0 durante 30 segundos. Identificou-se 2 tubos com tampa de rosca (tubo 1 e tubo 2). Ao tubo 1 (T1), adicionou-se 4,5mL de 7H9 com Tween 80 0,05% e 500µL da suspensão concentrada (250nm), o que correspondeu a uma diluição de 1:10. Ao tubo 2 (T2), adicionou-se 4,5mL de 7H9 com Tween 80 0,05% e transferiu-se 500µL de T1 (diluição de 1:10) para T2, correspondendo a uma diluição de 1:100 da suspensão inicial padronizada com DO de 0,25. Então, mediu-se a DO diariamente até o dia 7.

Para garantir que o inóculo inicial foi igual para todos os isolados, realizou-se o controle de concentração do inóculo (CCI). A partir de uma alíquota de 100µL do inóculo inicial, realizou-se diluições em solução salina de NaCl 0,9% + Tween 20 0,05% de 10, 100, 1000, 10000 e 100000 vezes. A seguir, plaqueou-se 40µL das diluições 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 em meio sólido 7H11 enriquecido com 10% de OADC, adicionando-se 2 inóculos de 20µL cada por quadrante de uma placa quadripartida. Vedou-se as placas em embalagens hermeticamente fechadas e incubou-se em estufa a 37°C por 30 dias. As colônias visíveis foram contadas com auxílio de lupa nos dias 7, 14, 21 e 30 após a inoculação nas placas. O número de colônias na diluição escolhida foi corrigido de acordo com a diluição e expresso em UFC/mL de acordo com a fórmula:

$$\text{UFC/mL do inóculo} = \text{n}^\circ \text{ colônias em } 40\mu\text{L} \times 25 (1000\mu\text{L}/40\mu\text{L}) \times 1/\text{diluição}$$

4.8.3 Análise da Curva de Crescimento dos Isolados de *M. tuberculosis* em BACTEC™ MGIT™ 960

Inoculou-se cada isolado de *M. tuberculosis* em 2 tubos de MGIT BBL (tubo A e tubo B) enriquecido com OADC (volume final com o inóculo de 8,3mL): ao tubo A, adicionou-se 500µL do inóculo de T1 (do item 4.9.2) que estava diluído em 1:10; assim a diluição final do tubo A correspondeu a 1:166. Ao tubo B, adicionou-se 500µL do inóculo de T2 (do item 4.9.2) que estava diluído em 1:100; assim a diluição do tubo B correspondeu a 1:1660.

Anotou-se, até o dia 12, os resultados de crescimento bacteriano (Tempo Para Positivização - TTP) registrados no equipamento BACTEC™ MGIT™ 960.

4.9 Análise Estatística

Armazenou-se todos os dados em planilhas do Excel. Para reconstrução haplotípica utilizou-se o programa PHASE v2.1.1 com confiança de 95%. Comparou-se as características demográficas e clínicas dos pacientes por meio do teste Qui-Quadrado de Pearson para variáveis categóricas e Kruskal-Wallis para variáveis contínuas, utilizando o programa STATA 9.0. Para comparação do perfil de acetilação com o tempo de negativação da cultura de escarro e com a carga bacilar, utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Para comparar as curvas de crescimento, utilizou-se uma estratégia de comparação de duas populações, com amostras independentes, distribuição normal e variâncias iguais porém desconhecidas. Todos os intervalos de confiança foram de 95% e o nível de significância para os testes utilizados foi de 0,05.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 População de Estudo

Um total de 70 pacientes foi selecionado para o estudo. Oito pacientes foram excluídos por não ser possível a extração do DNA genômico devido às suas amostras (escarro) apresentarem o material genético altamente degradado. Logo, o sequenciamento foi realizado em 62 pacientes. Destes, 8 foram excluídos do estudo por indefinição de genótipo por meio dos parâmetros utilizados no PHASE 2.1.1., ou devido perfil de acetilação não determinado. A caracterização genotípica do gene *NAT2* e a determinação do perfil de acetilação foram realizadas nos 54 pacientes ainda incluídos. Destes, 11 foram excluídos porque foram utilizados para padronização, além de não conterem dados microbiológicos. Por fim, a população, para comparação do perfil de acetilação com o tempo de negatização e a carga bacilar, compreendeu 43 indivíduos (Figura 9).

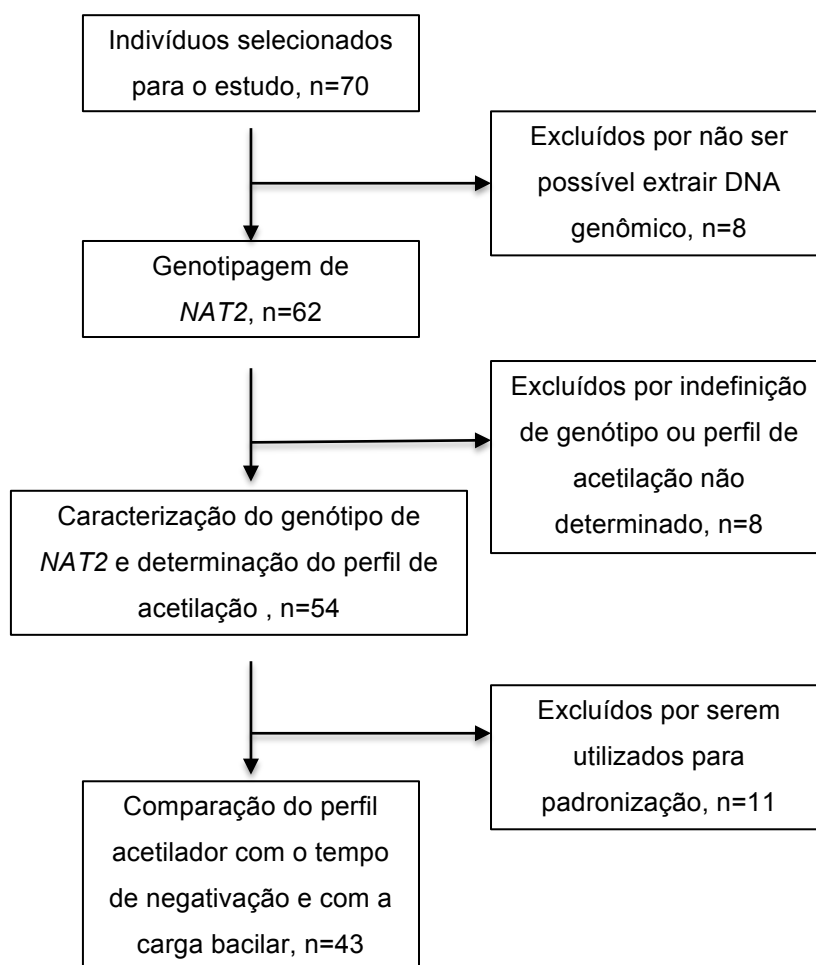


Figura 9. Fluxograma dos pacientes selecionados para o estudo.

5.2 Extração de DNA Genômico a Partir de Amostras de Escarro

Dos 62 indivíduos dos quais se obteve a extração do DNA genômico, em 20 deles o DNA foi extraído a partir de amostras de sangue total e em 42 deles o DNA foi extraído de amostras de escarro. Na extração do DNA de sangue total, foi obtido um ótimo rendimento do material de interesse. Porém, as amostras de escarro estavam armazenadas a -70°C desde 2003 e neste período pode ter havido eventos de interrupção de energia dos freezers que as continham, o que pode ter causado o congelamento e descongelamento algumas vezes dessas amostras. Além disso, o escarro contém muitas enzimas que podem ter influenciado na integridade dos ácidos nucleicos. Por isso, foi encontrada grande dificuldade em extrair o DNA de algumas amostras, pois o material genômico estava muito degradado (Figura 10).

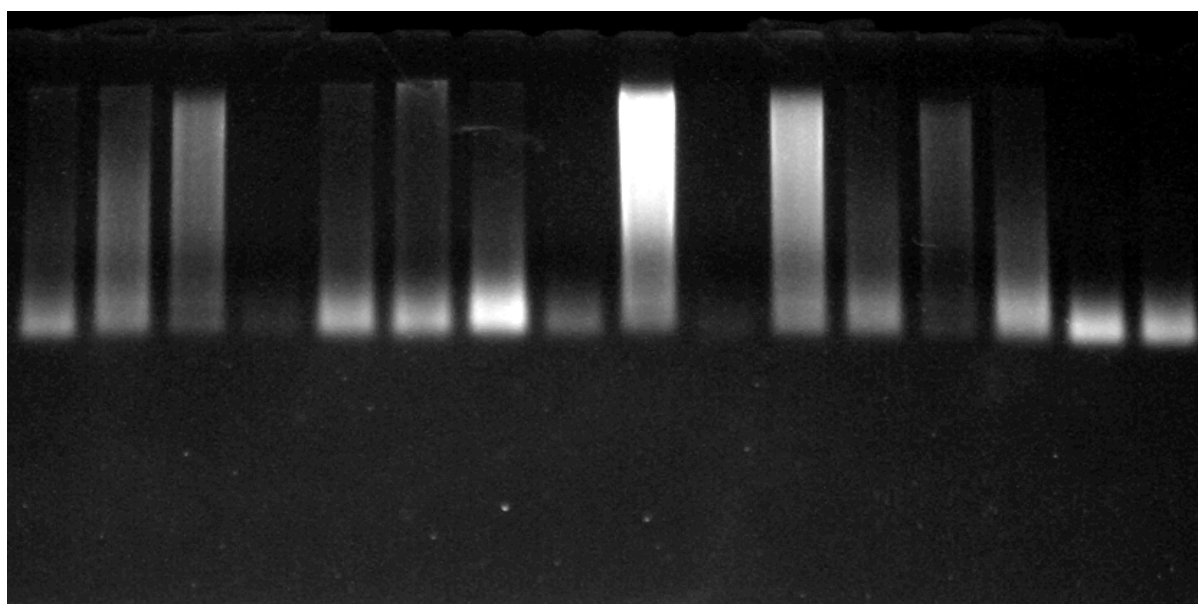


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1%. Extração de DNA genômico humano a partir de amostras de escarro.

5.3 Amplificação da Região Codificante do Gene *NAT2* por Técnica de PCR

Após a extração do DNA genômico humano, foi realizada a técnica de PCR para amplificação da região codificante do gene *NAT2*. Foram utilizadas duas estratégias diferentes. Na primeira estratégia foi amplificado um fragmento de 1093pb, contendo toda região codificante do gene alvo; na segunda, foram amplificados dois fragmentos menores, com tamanhos de 560 pb e 685 pb, que juntos formaram a

região codificante de *NAT2*. Como algumas amostras estavam com o DNA genômico muito degradado, foi necessária a utilização da segunda estratégia. Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído de sangue total de um voluntário sadio da área da saúde; como controle negativo foi utilizada a mistura da reação de PCR sem DNA. A figura 11 mostra um gel de agarose 1,5% com os fragmentos de interesse amplificados (560 pb, 685 pb e 1093 pb).

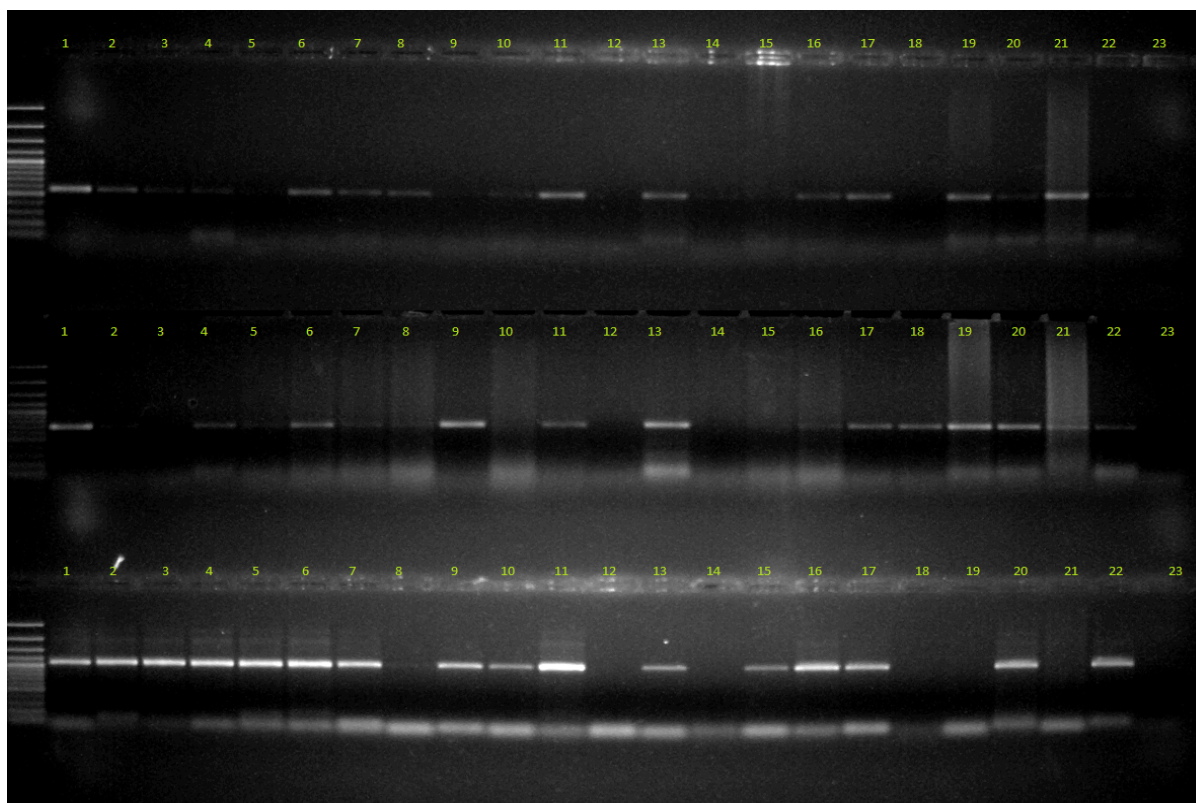


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando a amplificação por meio de PCR. No gel superior, as bandas positivas possuem 560 pb; no gel do meio, as bandas positivas possuem 685 pb; no gel inferior, as bandas positivas possuem 1093 pb. Os 3 géis são referentes às mesmas amostras. Primeiro poço de cada gel: Peso molecular 100 pb (Gene Ruler 100 pb Plus DNA ladder – Thermo Scientific). Poço 1: Controle positivo. Poços 2 – 22: Amostras de pacientes. Poço 23: Controle negativo.

Nas amostras que, mesmo após serem utilizadas as duas estratégias não se obteve o produto de PCR visualizado em gel de agarose, foi realizada a re-amplificação de seus respectivos produtos utilizando o mesmo protocolo (dados não mostrados).

5.4 Purificação dos Fragmentos a Partir do Produto Direto de PCR

Após amplificação, os produtos de PCR foram purificados para remoção de enzimas, sais e oligômeros para posterior sequenciamento. A figura 12 mostra um gel de agarose 1,5% com o produto amplificado após a purificação.

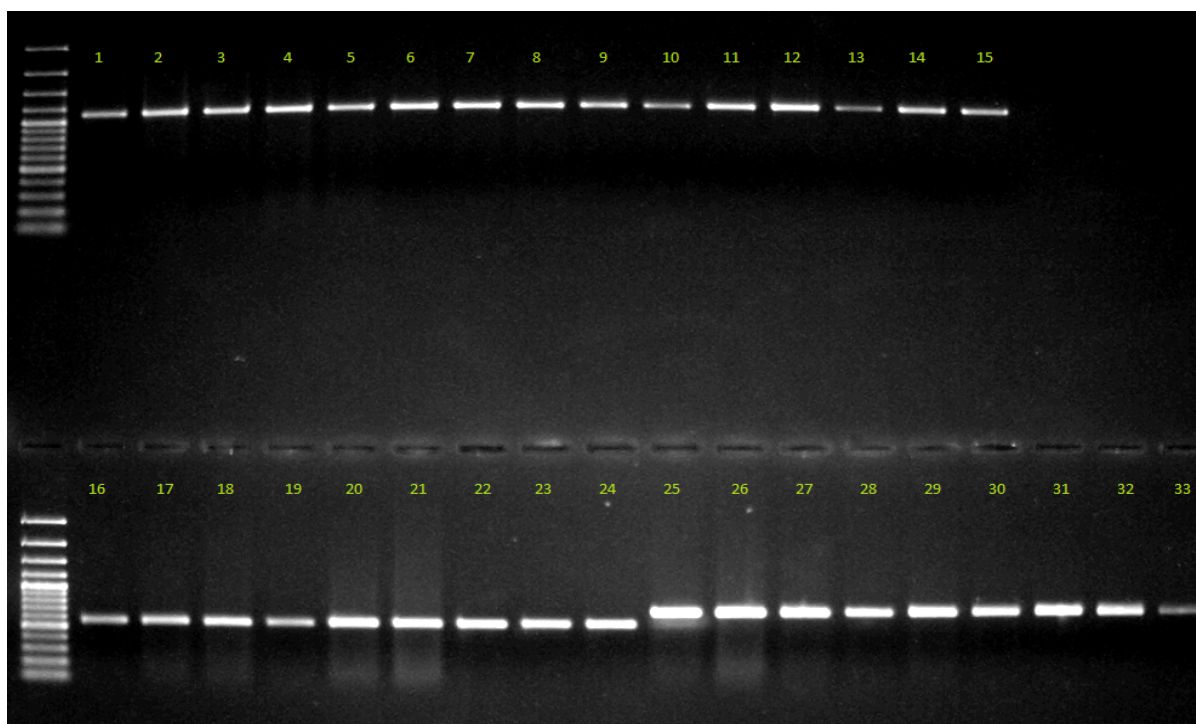


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando a purificação do produto direto do PCR. Os poços de 1 – 33 são de amostras de pacientes, sendo que: Poços 1 – 15 possuem bandas positivas com 1093 pb; poços 16 – 24 possuem bandas positivas com 560 pb e poços 25-33 possuem bandas positivas com 685 pb. O primeiro poço de cada gel (superior e inferior) contém o peso molecular (Gene Ruler 100 pb Plus DNA ladder – Thermo Scientific).

Para aquelas amostras que, mesmo após a purificação do produto amplificado em coluna cromatográfica ainda apresentaram bandas inespecíficas, utilizou-se um *kit* próprio para purificação diretamente de um gel preparatório de agarose 1,5%, por meio do recorte do fragmento específico com DNA (Figura 13).

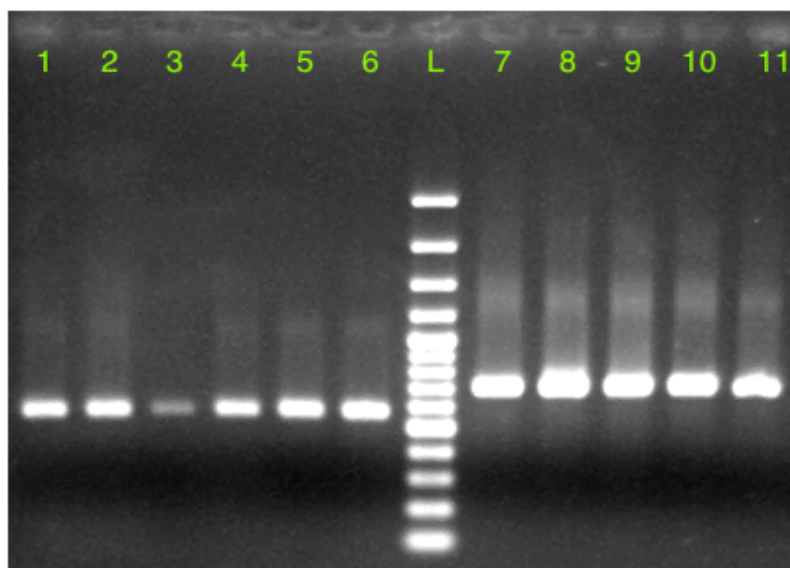


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando a purificação do produto a partir do gel preparatório. Poços 1 – 6 possuem bandas positivas com 560 pb; poços 7 – 11 possuem bandas positivas com 685 pb. L: peso molecular (Gene Ruler 100 pb Plus DNA ladder – Thermo Scientific).

5.5 Reação de Sequenciamento e Identificação de SNPs no Gene *NAT2*

Após a purificação, os produtos de PCR foram submetidos a 4 reações de sequenciamento automatizado a fim de se obter uma sequência completa e de boa qualidade da região de interesse. Para aperfeiçoar as análises das sequências obtidas de 62 amostras e identificar os SNPs presentes, foi utilizado o *software* SeqScape v.2.5 (Applied BioSystems). Tendo a sequência AY331807 como referência e alinhando-se as sequências obtidas, foram identificados diferentes SNPs na população estudada. A figura 14 e a 15 ilustram a utilização do SeqScape v.2.5. para identificação dos polimorfismos.

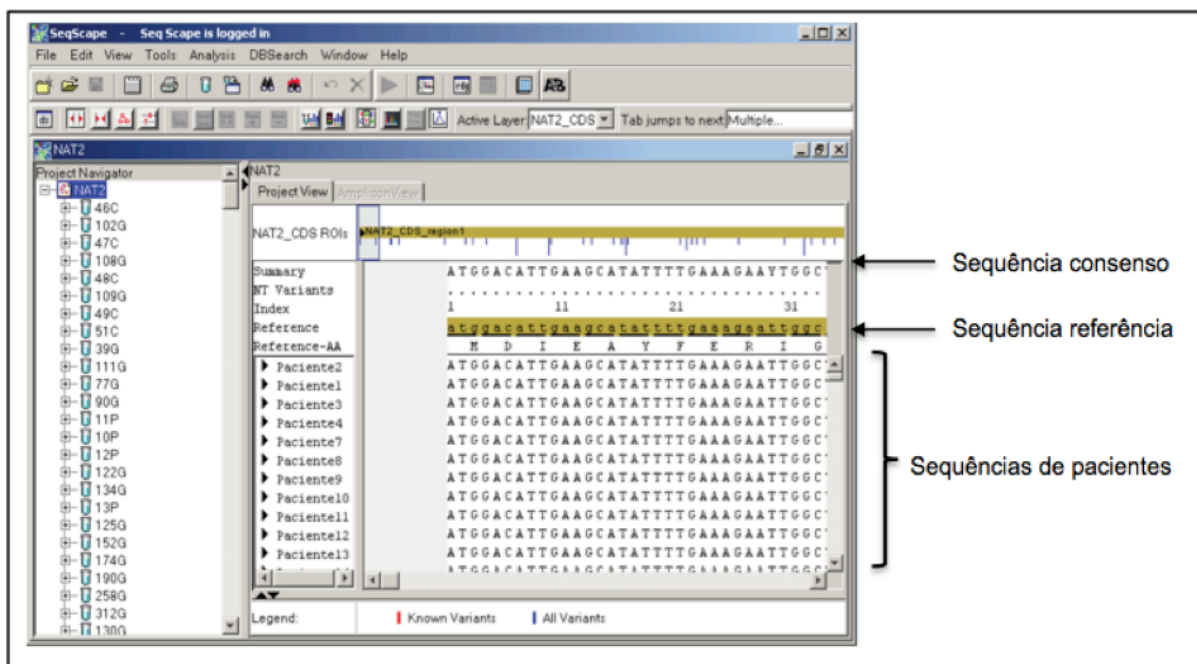


Figura 14. Interface do programa SeqScape v.2.5. Nesta imagem são visualizados a sequência consenso, a sequência referência e o alinhamento da sequência de DNA de diversos pacientes.

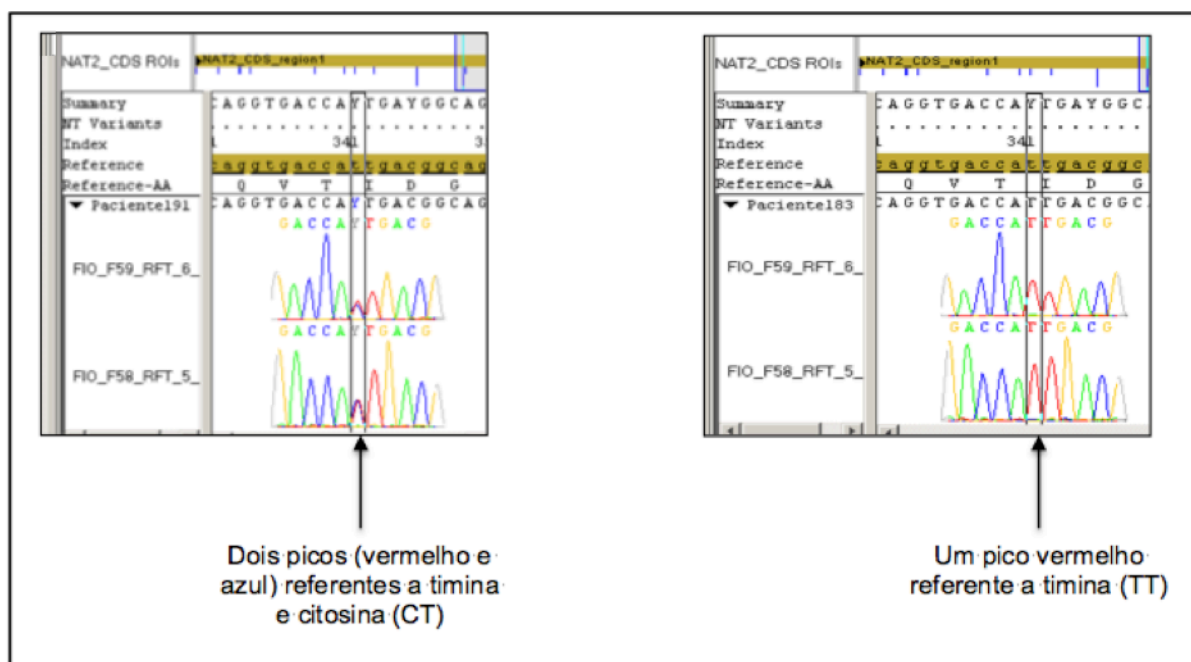


Figura 15. Eletroferograma visualizado dentro do programa SeqScape v.2.5. A seta da esquerda que mostra dois picos indica uma mutação heterozigota; a seta da direita que mostra um pico indica uma mutação homozigota.

5.6 Perfil de SNPs Entre a População Estudada

Por meio da técnica de sequenciamento direto do PCR, a análise de 62 amostras de DNA indicou a presença de 10 SNPs, dos quais 7 representam os que são mais frequentemente encontrados em populações no mundo e estão registrados no site oficial de nomenclatura de *NAT2* (www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html). A frequência alélica dos 10 SNPs detectados, a sequência proteica alterada e o efeito que eles exercem na função da proteína são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Frequência de mutações pontuais no gene *NAT2* na população de estudo.

SNPs	Frequência	Alteração do aa	Efeito
G191A ^a	1,61%	R64Q	Defectivo
C282T ^a	30,64%	Nenhuma	Nenhum
T341C ^a	39,65%	I114T	Defectivo
C403G	1,61%	L135V	Nenhum
A472C	0,81%	Nenhuma	Nenhum
C481T ^a	38,71%	Nenhuma	Nenhum
G590A ^a	23,40%	R197Q	Defectivo
A766G	0,81%	Nenhuma	Nenhum
A803G ^a	34,67%	K268R	Nenhum
G857A ^a	1,61%	G286E	Defectivo

^a. Sete SNPs mais comuns encontrados no mundo.

5.7 Determinação das Variantes Alélicas de *NAT2*

Quatorze haplótipos distintos foram encontrados na análise dos 62 pacientes estudados por meio do *software* PHASE 2.1.1., o que permitiu a caracterização dos alelos correspondentes de *NAT2*. A tabela 5 mostra a frequência de cada variante alélica encontrada. Dentre os alelos funcionais, o *NAT2*4* (tipo selvagem) foi o que teve maior frequência (24,29%). Dentre os alelos defectivos, o *NAT2*5B* e o *NAT2*6A* foram os que tiveram maior frequência com 29,03% e 23,39%, respectivamente.

Tabela 5. Frequência de variantes alélicas de *NAT2*.

Alelo	Haplótipo ^a	Frequência		Acetilação
		Total	%	
<i>NAT2</i> *4	GCTCACGAAG	30	24,29	Rápida
<i>NAT2</i> *5A	GCCCATGAAG	9	7,26	Lenta
<i>NAT2</i> *5B	GCCCATGAGG	36	29,03	Lenta
<i>NAT2</i> *5C	GCCCACGAGG	2	1,61	Lenta
<i>NAT2</i> *5D	GCCCACGAAG	1	0,81	Lenta
<i>NAT2</i> *6A	G TTCACAAAG	29	23,39	Lenta
<i>NAT2</i> *7B	G TTCACGAAA	2	1,61	Lenta
<i>NAT2</i> *12A	GCTCACGAGG	3	2,42	Rápida
<i>NAT2</i> *12C	GCTCATGAGG	2	1,61	Rápida
<i>NAT2</i> *13A	G TTCACGAAG	4	3,23	Rápida
<i>NAT2</i> *14B	ATTCACGAAG	2	1,61	Lenta
ND	GCTGACGAAG	2	1,61	ND
ND	GCCCCTGAAG	1	0,81	ND
ND	G TTCACGGAG	1	0,81	ND

^a. Posições dos nucleotídeos dentro da região codificante de *NAT2*: 191, 282, 341, 403, 472, 481, 590, 766, 803 e 857. ND: Não determinado.

5.8 Caracterização Genotípica do Gene *NAT2* e Determinação Preliminar do Perfil de Acetilação

Para caracterização do gene *NAT2*, das amostras dos 62 indivíduos sequenciados, 8 foram excluídos por incerteza de genótipo ou pelo perfil de acetilação não determinado. Logo, a caracterização genotípica e a determinação do perfil de acetilação foram realizadas em 54 pacientes.

A distribuição de frequências genotípicas e a predição dos fenótipos estão listadas na tabela 6. Quinze genótipos diferentes foram encontrados com o predomínio de perfil de acetilação lento (48,1%) e o genótipo mais observado foi o *5B/*5B com a frequência de 20,4%. O perfil intermediário apresentou 38,9% de frequência e o genótipo mais observado desta categoria foi o *4/*5B (13%). Já o perfil de acetilação rápido representou apenas 13% de todos os indivíduos, com predomínio do genótipo *4/*4 (9,3%).

Tabela 6. Perfis de acetilação e genótipos dos pacientes do estudo. FF, FS e SS = fenótipo homozigoto rápido, heterozigoto intermediário e homozigoto lento.

Fenótipo	Genótipo	Pacientes (n)	Frequência (%)
Rápido (FF)	<i>NAT2*4/*4</i>	5	9,3
	<i>NAT2*4/*13A</i>	2	3,7
Intermediário (FS)	<i>NAT2*4/*5A</i>	5	9,3
	<i>NAT2*4/*5B</i>	7	13,0
	<i>NAT2*4/*5D</i>	1	1,9
	<i>NAT2*4/*6A</i>	4	7,4
	<i>NAT2*12C/*6A</i>	2	3,7
	<i>NAT2*13A/*5B</i>	1	1,8
	<i>NAT2*13A/*6A</i>	1	1,8
Lento (SS) ^a	<i>NAT2*5B/*5B</i>	11	20,4
	<i>NAT2*5A/*6A</i>	4	7,4
	<i>NAT2*5B/*6A</i>	3	5,5
	<i>NAT2*5C/*6A</i>	2	3,7
	<i>NAT2*6A/*6A</i>	5	9,3
	<i>NAT2*14B/*6A</i>	1	1,8
		Total = 54	100

5.9 Caracterização da População Seleccionada Para Comparação do Perfil de Acetilação de INH com o Tempo de Negativação da Cultura de Escarro e com a Carga Bacilar

Para esta análise, foram seleccionados 43 indivíduos. As variáveis demográficas e clínicas dos pacientes estudados nos 3 grupos classificados de acordo com tempo de negativação da cultura estão descritas na tabela 7.

Tabela 7. Distribuição das variáveis demográficas e clínicas para os grupos classificados de acordo com o tempo de negatização da cultura.

Características	Tempo de Negatização da Cultura			Valor de p
	Mês 1 (n=12)	Mês 2 (n=22)	Mês 3 (n=9)	
Média de idade (anos $\pm$ DP ^a)	40 $\pm$ 12,89	38,2 $\pm$ 11,57	35,9 $\pm$ 6,15	0,83 ^b
Nº de homens (% total)	6 (50)	13 (59)	7 (77,8)	0,40 ^c
Média de IMC* $\pm$ DP ^a	23 $\pm$ 5,09	22,1 $\pm$ 3,86	19,8 $\pm$ 2,26	0,09 ^b
Gravidade da doença – Radiografia (%)				
Mínima	4(33,3)	5 (22,7)	1 (11,1)	0,43 ^c
Moderada	6 (50)	8 (36,4)	3 (33,3)	
Avançada	2 (16,7)	9 (40,9)	5 (55,6)	

*IMC: Índice de Massa Corporal. Peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros.

^a. DP: Desvio padrão

^b. Kruskal-Wallis

^c. Qui-Quadrado de Pearson

Ao se analisar as variáveis contínuas, a média de idade e de IMC na população estudada não foi estatisticamente diferente entre os 3 grupos.

Em relação ao sexo, houve predomínio do sexo masculino nos grupos do mês 2 e mês 3. A porcentagem total de homens participantes do projeto foi de 60,5%. Não foram observadas diferenças estatísticas com relação ao sexo entre os grupos.

A partir da análise do exame radiográfico de tórax, foi verificado que 76,7% do total de indivíduos apresentaram doença moderada ou avançada, ao passo que apenas 23,3% apresentaram doença de gravidade mínima. Quando se comparou gravidade da doença (mínima, moderada e avançada) com os 3 grupos de tempo de negatização da cultura (mês 1, mês 2 e mês 3), não foi encontrada diferença estatística ($p=0,43$). Mesmo quando a gravidade da doença foi separada em dois grupos, mínima e moderada/avançada, não houve diferença estatística com o tempo de negatização ($p=0,49$).

5.10 Comparação do Perfil de Acetilação de INH com o Tempo de Negativação da Cultura de Escarro

Ao se comparar uma possível relação entre o perfil de acetilação da isoniazida com o tempo de negativação da cultura de escarro dos 43 pacientes selecionados, não se observou diferença estatística entre as mesmas. (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação do Perfil de Acetilação da INH com o Tempo de Negativação da Cultura de Escarro.

Perfil de Acetilação	Tempo de Negativação da Cultura			Valor de p
	Mês 1 (n=12)	Mês 2 (n=22)	Mês 3 (n=9)	
Lenta (%)	7 (58,3)	8 (36,4)	5 (55,6)	0,55 ^a
Intermediária (%)	4 (33,3)	11 (50)	2 (22,2)	
Rápida (%)	1 (8,4)	3 (13,6)	2 (22,2)	

^a. Teste Exato de Fisher

5.11 Comparação entre Tempo de Negativação da Cultura de Escarro e Carga Bacilar

Ao se comparar uma possível relação entre o tempo de negativação da cultura de escarro com a carga bacilar de 43 pacientes selecionados, não foi observado diferença estatística entre estas duas variáveis (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação do Tempo de Negativação da Cultura de Escarro com Carga Bacilar.

Carga Bacteriana	Tempo de Negativação			Valor de p
	Mês 1 (n=12)	Mês 2 (n=22)	Mês 3 (n=9)	
Baixa (CFU $\leq$ 4 log)	7 (58,3)	7 (31,8)	3 (33,3)	0,29 ^a
Alta (CFU > 4 log)	5 (41,7)	15 (68,2)	6 (66,7)	

^a. Teste Exato de Fisher

5.12 Análise da Curva de Crescimento dos Isolados de *M. tuberculosis* em Meio de Cultura Líquido Middlebrook 7H9

Foram selecionadas 21 isolados de *M. tuberculosis* para realização de curvas de crescimento, referentes aos pacientes que tiveram sua cultura de escarro convertida para negativo no mês 1 e no mês 3. Porém, no subcultivo, 3 isolados foram contaminados. Assim, 18 isolados de *M. tuberculosis* tiveram suas curvas de crescimento comparadas entre si, por meio da leitura de DO, diariamente, do dia 0 até o dia 7. Dez isolados foram referentes aos indivíduos que tiveram a negatificação da cultura de escarro no mês 1 e 8 isolados foram referentes aos indivíduos que tiveram a negatificação da cultura de escarro no mês 3. Cada curva foi comparada de acordo com a leitura da DO. De acordo com a análise, as curvas de crescimento dos isolados dos grupos do mês 1 e do mês 3 mostraram o mesmo perfil de crescimento, ou seja, apresentaram DOs semelhantes ao mesmo tempo (Figuras 16 e 17).

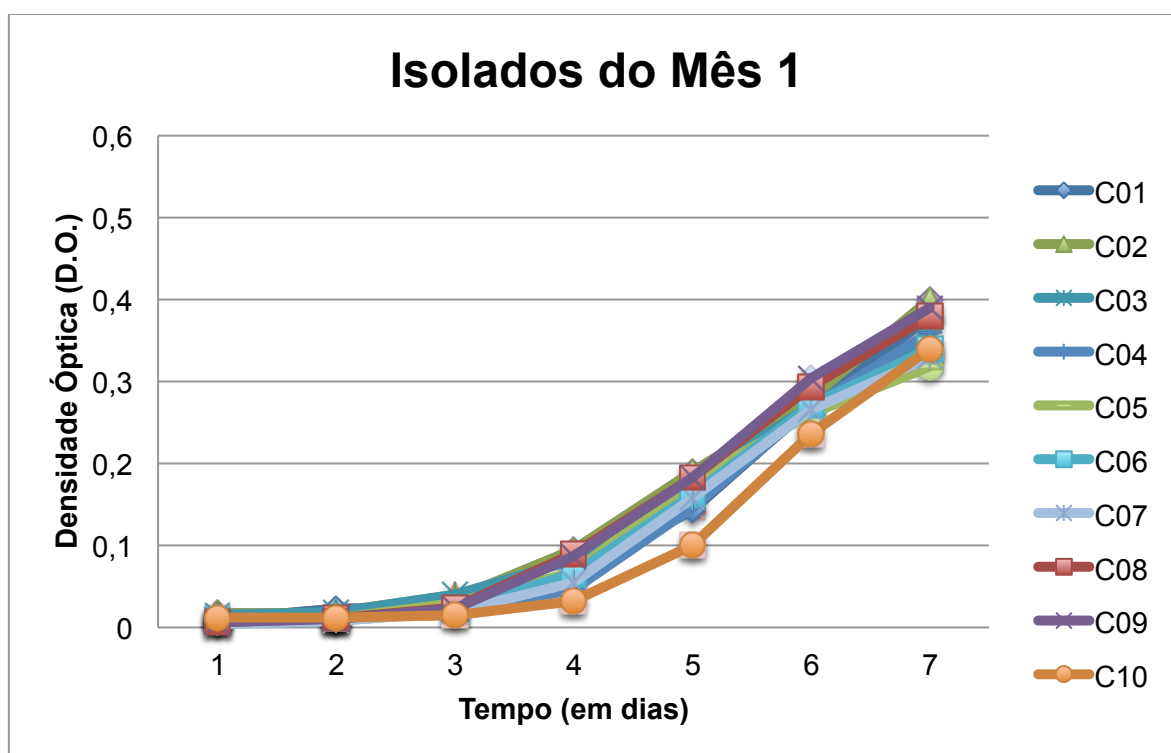


Figura 16. Curvas de crescimento em Middlebrook 7H9 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negatificação de suas culturas de escarro no mês 1 (n=10). C01-C10: isolado referente a cada paciente.

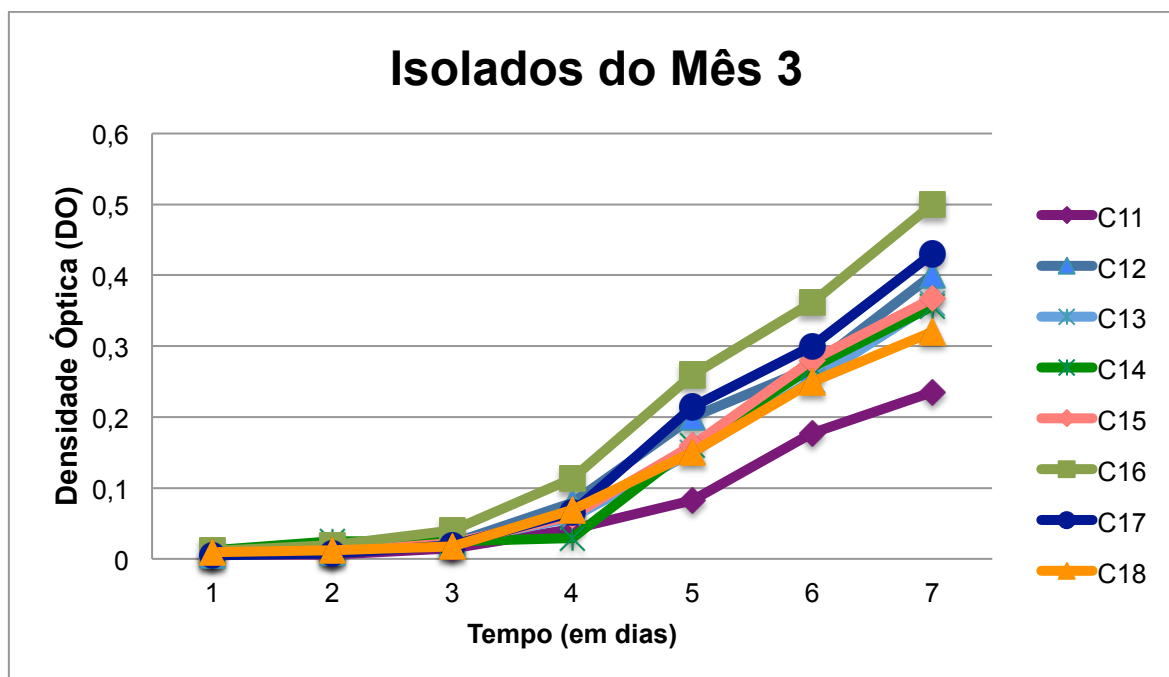


Figura 17. Curvas de crescimento em Middlebrook 7H9 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negatificação de suas culturas de escarro no mês 3 (n=8). C11-C18: isolado referente a cada paciente.

5.13 Análise da Curva de Crescimento de Isolados de *M. tuberculosis* em BACTEC™ MGIT™ 960

Curvas de crescimento em meio MGIT de 18 isolados de *M. tuberculosis* foram construídas de acordo com a leitura do tempo para positividade (TTP). Foram comparados 10 isolados de pacientes que apresentaram negatificação de suas culturas no mês 1, com 8 isolados de pacientes que apresentaram negatificação de suas culturas no mês 3. A duração da fase lag de crescimento foi determinada como o início da incubação até o alcance de 75 GU, que é o ponto de corte, ou seja, é a duração do TTP. De acordo com as análises, a média de TTP dos isolados do mês 1 foi de 102,9 horas e a média de TTP dos isolados do mês 3 foi de 96,1 horas. Na análise não foi encontrada diferença significativa entre as curvas, ou seja, a média de TTP de crescimento dos isolados do mês 1 de negatificação é estatisticamente igual à média de TTP de crescimento dos isolados do mês 3 (Figuras 18 e 19).

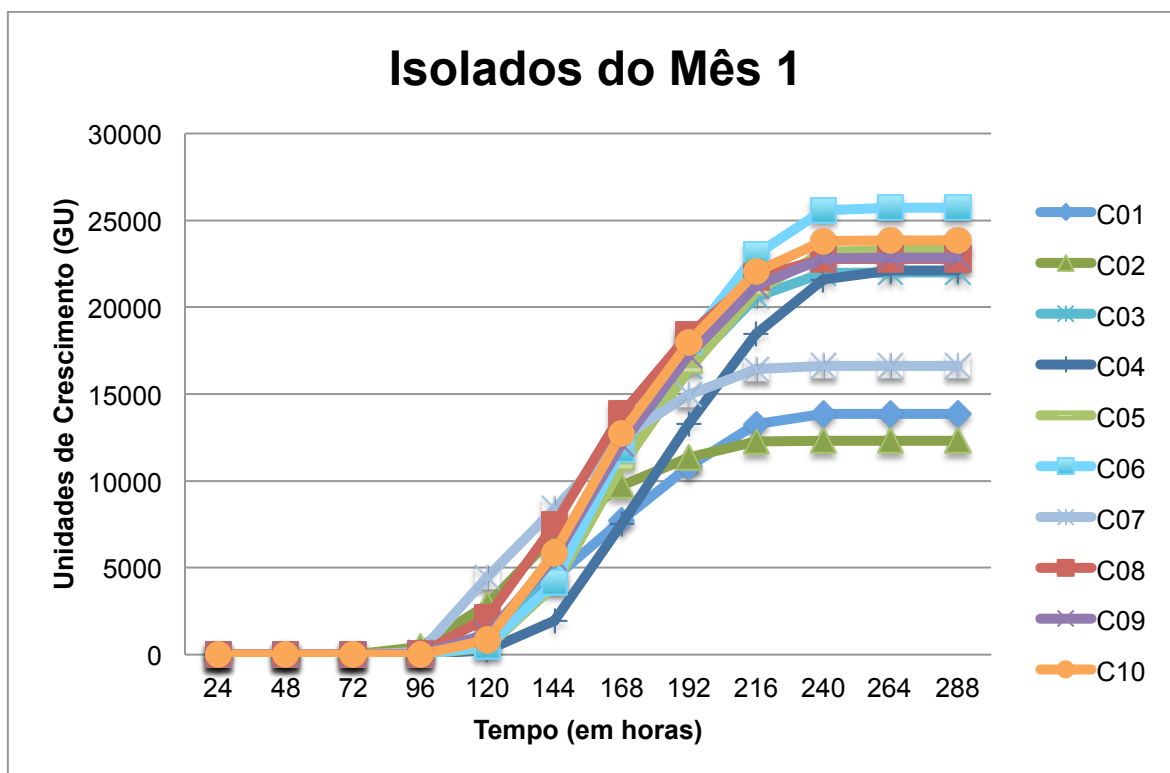


Figura 18. Curvas de crescimento em BACTEC MGIT 960 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negatização de suas culturas de escarro no mês 1 (n=10). C01-C10: isolado referente a cada paciente.

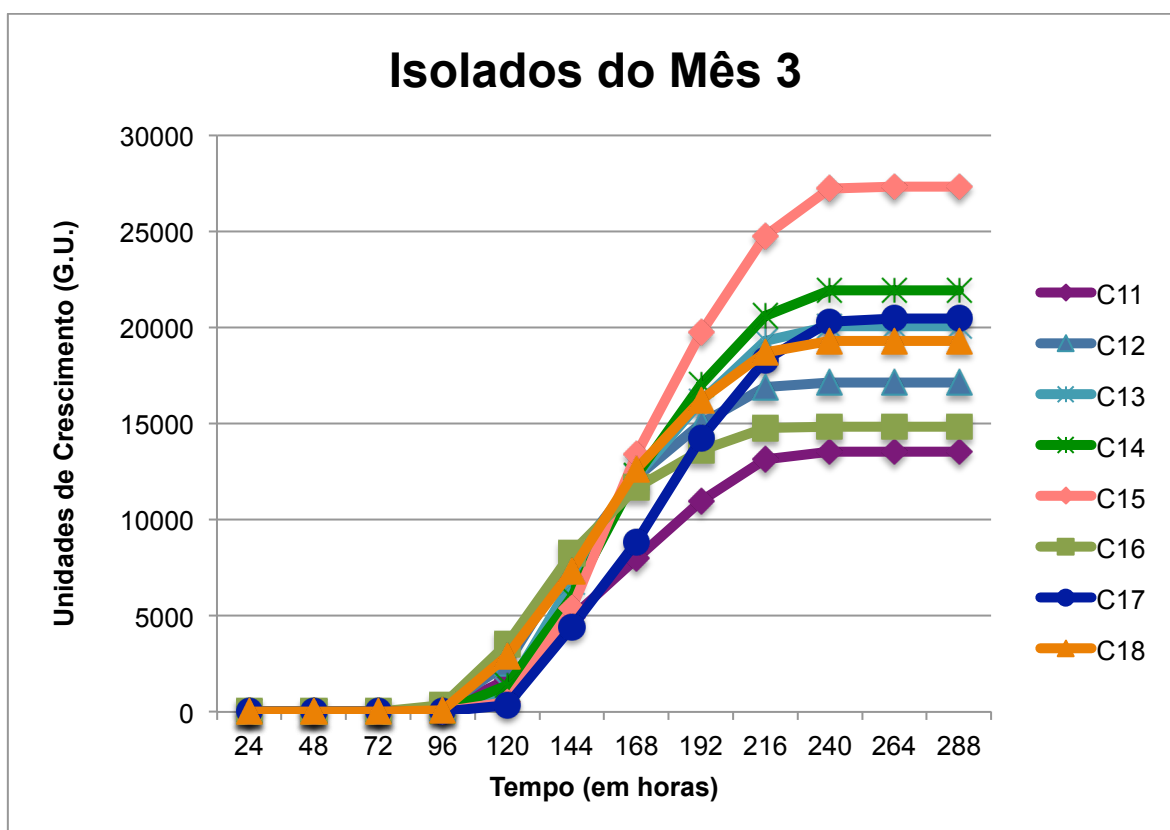


Figura 19. Curvas de crescimento em BACTEC MGIT 960 dos isolados de *M. tuberculosis* oriundos dos pacientes que tiveram a negatização da cultura de escarro no mês 3 (n=8). C11-C18: isolado referente a cada paciente.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os pacientes com tuberculose apresentam uma grande variedade de respostas ao tratamento com fármacos anti-TB. Embora nos primeiros dias de tratamento ocorra uma grande redução da carga bacilar devido a atividade bactericida precoce da isoniazida e da rifampicina (JINDANI, DORE e MITCHISON, 2003), alguns indivíduos demoram mais tempo do que outros para apresentarem resultados de cultura negativa, ou seja, sem crescimento de bacilos, mesmo que o esquema de medicamentos seja administrado na posologia correta e na duração adequada. Além disso, alguns indivíduos que apresentam cultura de escarro com carga bacilar inicialmente alta têm a sua conversão para negativo já no primeiro mês de tratamento, enquanto outros, que apresentam carga bacilar inicialmente baixa, têm cultura de escarro que dura até 3 meses para ser convertida.

Considerando que entre os indivíduos existem polimorfismos genéticos em um gene que codifica a enzima responsável pela variação nas concentrações sistêmicas de isoniazida (DEGUCHI *et al.*, 1990; PARKIN *et al.*, 1997), principal fármaco do esquema de tratamento para tuberculose, buscamos compreender de forma mais clara o efeito que essas mutações genéticas podem exercer sobre o tempo de redução ou eliminação na carga bacilar do escarro.

Assim, para realização deste trabalho, selecionamos 70 pacientes que participaram de ensaios clínicos realizados previamente no NDI-UFES. Embora não tenha sido o objetivo principal, a extração, amplificação e purificação do material genômico a partir de escarro congelado consistiu em uma etapa fundamental deste estudo, com o intuito de não submetermos os pacientes à punção venosa para coleta de sangue. É importante destacar que este é o primeiro relato descrito na literatura de sequenciamento do gene *NAT2* a partir de DNA genômico extraído de amostras de escarro congeladas por um longo período. Ainda, obtivemos grande sucesso na utilização de escarro pois conseguimos extrair o DNA genômico 84% das amostras (42 de 50 pacientes).

Todos os pacientes selecionados foram submetidos à técnica de extração do DNA genômico, porém só foi possível a extração do DNA de 62 pacientes, os quais

submetemos à análise do sequenciamento da região codificante do gene *NAT2* e detectamos a presença de 10 SNPs, 7 deles descritos como os mais frequentes no mundo (www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html). As mutações pontuais 191 G>A, 341 T>C, 590 G>A e 857 G>A são relacionadas aos fenótipos de acetilação lento, enquanto que as mutações 282 C>T, 481 C>T e 803 A>G não conferem nenhuma alteração no fenótipo (FRETLAND *et al.*, 2001). As mutações 403 G>A, 472 A>C e 766 A>G são silenciosas e foram encontradas com frequências menores de 2% entre os indivíduos. O SNP 341 T>C, que caracteriza acetiladores lentos, foi encontrado em maior frequência com 39,65%, e se assemelha a dados encontrados em estados do Brasil, como Rio de Janeiro e Goiás, com 40% e 33% respectivamente (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Os nossos dados corroboram dados encontrados no país e sugerem que a população brasileira apresente um predomínio de fenótipos acetiladores lentos.

Os 10 SNPs detectados neste estudo permitiram a caracterização de 14 alelos distintos entre os indivíduos. Três deles ainda não foram descritos, portanto não temos informações sobre sua atividade funcional. Dos 11 alelos restantes, 7 deles são defectivos e 4 são funcionais. Dentre os alelos defectivos que caracterizam o fenótipo de acetilação lento, o *NAT2*5B* (29,03%) e o *NAT2*6A* (23,39%) foram os mais frequentes. Dos alelos funcionais, o *NAT2*4* (24,29%) foi o mais frequente. Tanto os alelos defectivos quanto o funcional predominantes na população de estudo vão ao encontro das frequências encontradas por Teixeira e colaboradores (2007), que detectaram frequências de 33% (*NAT2*5B*), 26% (*NAT2*6A*) e 20% (*NAT2*4*). Logo, observamos que pode haver um predomínio de alelos defectivos na população brasileira.

Após a exclusão de 3 SNPs que não permitiram a determinação do fenótipo, a caracterização genotípica e a determinação do perfil de acetilação foram obtidas de 54 pacientes. Encontramos 15 genótipos distintos com predomínio do perfil de acetilação lento (48,1%) representado principalmente por **5B/*5B*. Os pacientes caracterizados como acetiladores intermediários corresponderam a 38,9% do total, com o genótipo **4/*5B*. O perfil de acetilação rápido foi o encontrado em menor proporção com apenas 13% do total, com predomínio do genótipo **4/*4*. Apesar da porcentagem de acetiladores lentos ter sido maior aparentemente, ao aplicarmos o

teste para amostras aleatórias e independentes identificamos que não existem diferenças estatisticamente significantes entre a frequência de acetiladores intermediários e lentos. Além destes 3 genótipos mais frequentes, encontramos 12 que são encontrados em frequências variadas no mundo. A presença desses genótipos pode ser explicada pela grande diversidade étnica que existe no Brasil, oriunda desde os tempos de sua colonização, devido a miscigenação entre nativo-americanos e imigrantes de vários continentes, principalmente da Europa, o que pode ter influenciado na ampla distribuição de variantes alélicas distintas do gene *NAT2* pelo país (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Com relação às variáveis demográficas e clínicas, utilizamos dados de 43 pacientes e não encontramos nenhuma associação entre idade, IMC, sexo e gravidade da doença entre os grupos (mês 1, mês 2 e mês 3). Embora alguns autores tenham descrito na literatura que a gravidade da doença é um dos fatores relacionados ao atraso no tempo de conversão, tanto da baciloscopia quanto da cultura (GULER *et al.*, 2007; VISSER *et al.*, 2012), quando comparamos essas duas variáveis não encontramos evidência estatística. Uma possível explicação para o encontro de dados controversos é que quando estratificamos os 43 pacientes, o tamanho amostral ficou muito pequeno em cada grupo e podemos ter cometido um erro estatístico do tipo II.

Uma das principais finalidades deste estudo foi detectar o possível efeito que o tipo de perfil acetilador do paciente poderia exercer em relação ao tempo de negativação da cultura de escarro. Acreditávamos que os pacientes que possuem um perfil lento de acetilação, pelo fato do fármaco permanecer por maior tempo no sangue em relação aos acetiladores intermediários e rápidos (WEBER e HEIN, 1979), teriam um tempo mais curto de conversão da cultura de escarro.

Ao fazermos uma busca detalhada na literatura, encontramos no trabalho de Evans e colaboradores (1960) a citação de um estudo de Mitchell e colaboradores (1958) com objetivos semelhantes ao nosso, no qual aquele afirma que estes investigaram o tempo de negativação da cultura de escarro em pacientes com tuberculose pulmonar cavitária tratados com isoniazida e outros fármacos e compararam com o perfil de acetilação do paciente. Porém, como o trabalho foi apresentado em

congresso e seus autores não o publicaram em revistas (indexadas) não dispomos de elementos para uma análise comparativa detalhada. De acordo com os resultados de nosso estudo, de toda forma pioneiro, tal hipótese foi refutada. Novamente, podemos ter encontrado que não existe associação entre o perfil de acetilação e o tempo de negativação da cultura devido ao tamanho da amostra.

Para Ellard (1984), mesmo que a exposição dos acetiladores lentos a isoniazida seja consideravelmente maior do que a de acetiladores rápidos, isso não implica nenhuma importância clínica, exceto naqueles indivíduos que recebem tratamento intermitente uma vez por semana. Em seu estudo, o autor ainda afirmou que a eliminação polimórfica da isoniazida não teve influência no desfecho terapêutico de pacientes que receberam tratamento supervisionado (ELLARD, 1984).

Porém, Azuma e colaboradores (2012), afirmaram que o risco de falência no tratamento é maior nos acetiladores rápidos, tratados com a dose convencional de isoniazida, além de pontuarem que a incidência de hepatotoxicidade induzida pelo fármaco diminuiu notavelmente com a estratificação da dose guiada pelo perfil acetilador de NAT2, hipótese também confirmada por outros trabalhos (TEIXEIRA *et al.*, 2010; AN *et al.*, 2012; CHAMORRO *et al.*, 2013). Além disso, os benefícios terapêuticos potenciais para aqueles que são acetiladores lentos são consideravelmente maiores do que os acetiladores intermediários e rápidos, enquanto que os acetiladores rápidos estão mais propensos a uma resposta terapêutica ineficaz e desenvolverem TB crônica (PARKIN *et al.*, 1997; DONALD *et al.*, 2004).

Muitos dos pacientes analisados no nosso estudo foram tratados com regimes poliquimioterápicos. Para nossa análise, o ideal seria a avaliação de pacientes aos quais fossem administrados apenas a isoniazida, pois o uso de rifampicina poderia reduzir o tempo de negativação da cultura de escarro. Porém o uso de isoniazida em monoterapia por muito tempo não é recomendado, visto que induz o surgimento de resistência. Mesmo assim, vimos que apesar da rifampicina estar em associação no tratamento, parece que ela não potencializou a ação da isoniazida na redução do tempo de negativação.

Uma das vantagens encontradas no presente estudo é que todos os pacientes foram provenientes de ensaios clínicos, o que pressupõe que os dados clínicos e terapêuticos, os critérios de inclusão, de exclusão, o acompanhamento dos pacientes, a coleta de dados e a avaliação microbiológica das amostras de escarro foram rigorosamente controlados, inclusive a administração da isoniazida e dos outros fármacos, que foi realizada por enfermeiros treinados para garantir que todos os pacientes tomassem os comprimidos na dosagem e horário corretos.

Como detectamos que o tipo de acetilação não influencia no tempo de conversão da cultura de escarro, depreende-se que a utilidade primordial de se determinar o perfil de acetilação de um paciente submetido a regimes terapêuticos que contém isoniazida torna-se o ajuste de doses para cada perfil acetilador com o intuito de potencializar a eficácia terapêutica e diminuir o grau de hepatotoxicidade induzida pelo fármaco.

Ainda neste trabalho, investigamos se a carga bacilar inicial de um paciente teria alguma influência diretamente proporcional no tempo de negativação da cultura de escarro, com a lógica de que os pacientes com carga bacilar baixa demorariam menos tempo para eliminar os bacilos presentes no escarro. Entretanto, nossos resultados mostraram que não existe relação estatística entre carga bacilar e tempo de conversão do escarro, visto que 3 de 9 pacientes com carga bacilar inicialmente baixa tiveram a conversão da cultura apenas no mês 3 de tratamento.

Para o controle da infecção, a avaliação da conversão da cultura de escarro é um dos principais fatores a serem observados nos pacientes em vigência de tratamento anti-TB, pois é um biomarcador de cura, quando a conversão ocorre até 2 meses do início do tratamento (WALLIS *et al.*, 2009). Condições como a existência de cavidade nos pulmões atrasam o tempo de negativação da cultura (GULER *et al.*, 2007; HORITA *et al.*, 2012). Porém, mais do que isso, existem inúmeros outros fatores que podem prolongar o tempo de conversão para mais de 2 meses como diabetes, idade, extensão da doença, interações com outros fármacos e fatores genéticos dos indivíduos (GULER *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009; LAWSON *et al.*, 2010).

Por fim, selecionamos os isolados de *M. tuberculosis* dos pacientes em dois grupos: os que tiveram a negatificação da cultura no mês 1 e os que tiveram a negatificação da cultura no mês 3, com o intuito de analisar se esses isolados do grupo do mês 1 apresentariam a duração da fase lag mais encurtada do que os isolados do grupo do mês 3. Por meio da construção de curvas de crescimento, uma provável diferença no tempo para positividade entre os dois grupos poderia sugerir uma das explicações para demora no tempo de conversão de cultura, devido ao fato dos fármacos anti-TB não conseguirem agir efetivamente na bactéria em fase lag (sem multiplicação bacteriana e com metabolismo baixo). Entretanto, os nossos resultados não mostraram diferença no tempo para positividade entre os dois grupos, sendo que a média de TTP no mês 1 foi de 102,9h e no mês 3 o TTP foi de 96,1h.

Para realização das curvas de crescimento, devemos reconhecer que todos os isolados foram submetidos às mesmas condições ambientais e disponibilização de nutrientes *in vitro*. Pode ser que por esses motivos, os isolados cresceram de maneira homogênea, ao passo que quando o bacilo encontra-se em crescimento dentro do organismo humano, apesar dos fatores responsáveis pela persistência micobacteriana (positividade da cultura durante a terapia) ainda não estarem bem esclarecidos, sabe-se que incluem fatores biológicos e comportamentais do hospedeiro (WALLIS *et al.*, 1999).

Embora os resultados apresentados não tenham mostrado associação estatística entre tempo de negatificação da cultura de escarro, perfil de acetilação de isoniazida, carga bacilar e gravidade da doença, estudos futuros devem ser realizados para uma investigação mais aprofundada dos fatores que influenciam o tempo de negatificação da cultura de escarro e como o perfil de acetilação da isoniazida pode auxiliar na cura dos pacientes com tuberculose.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

1 – A extração de material genômico a partir de escarro congelado por longo período foi possível para a maioria das amostras.

2 – A caracterização genotípica do gene *NAT2* e a determinação do perfil de acetilação, associados a dados nacionais, sugerem que pode haver um predomínio do perfil de acetilação lento na população brasileira.

3 – Não houve associação entre o perfil genotípico de acetilação da isoniazida e o tempo de negativação da cultura de escarro nos pacientes analisados.

4 – Não houve associação entre carga bacilar e o tempo de negativação da cultura de escarro nos pacientes analisados.

5 – Não houve associação entre a gravidade da doença e o tempo de negativação da cultura de escarro nos pacientes analisados.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, C. [Standardization of laboratory tests for tuberculosis and their proficiency testing]. **Kekkaku**, v.78, n.8, Aug, p.541-551. 2003.
- ALCAIDE, F., BENITEZ, M. A., ESCRIBA, J. M. e MARTIN, R. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. **J Clin Microbiol**, v.38, n.1, Jan, p.398-401. 2000.
- ALTMAN, R. B. e KLEIN, T. E. Challenges for biomedical informatics and pharmacogenomics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.42, p.113-133. 2002.
- AN, H. R., WU, X. Q., WANG, Z. Y., ZHANG, J. X. e LIANG, Y. NAT2 and CYP2E1 polymorphisms associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese patients. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.39, n.6, Jun, p.535-543. 2012.
- AZUMA, J., OHNO, M., KUBOTA, R., YOKOTA, S., NAGAI, T., TSUYUGUCHI, K., OKUDA, Y., TAKASHIMA, T., KAMIMURA, S., FUJIO, Y. e KAWASE, I. NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: A randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. **Eur J Clin Pharmacol**, Nov 14. 2012.
- BELISLE, J. T., VISSA, V. D., SIEVERT, T., TAKAYAMA, K., BRENNAN, P. J. e BESRA, G. S. Role of the major antigen of Mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis. **Science**, v.276, n.5317, May 30, p.1420-1422. 1997.
- BERNSTEIN, J., LOTT, W. A., STEINBERG, B. A. e YALE, H. L. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. **Am Rev Tuberc**, v.65, n.4, Apr, p.357-364. 1952.
- BLUM, M., GRANT, D. M., MCBRIDE, W., HEIM, M. e MEYER, U. A. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. **DNA Cell Biol**, v.9, n.3, Apr, p.193-203. 1990.
- BODIGUEL, J., NAGY, J. M., BROWN, K. A. e JAMART-GREGOIRE, B. Oxidation of isoniazid by manganese and Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase yields a new mechanism of activation. **J Am Chem Soc**, v.123, n.16, Apr 25, p.3832-3833. 2001.
- BONICKE, R. e REIF, W. [Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hydrazide in human and animal organism]. **Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol**, v.220, n.4, p.321-323. 1953.
- BOXENBAUM, H. G., BERKERSKY, I., MATTALIANO, V. e KAPLAN, S. A. Plasma and salivary concentrations of isoniazid in man: preliminary findings in two slow acetylators subjects. **J Pharmacokinetic Biopharm**, v.3, n.6, Dec, p.443-456. 1975.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. 2011. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_tb.pdf>. Acesso em: 13 de maio 2013.

CAETANO MOTA, P., CARVALHO, A., VALENTE, I., BRAGA, R. e DUARTE, R. Predictors of delayed sputum smear and culture conversion among a Portuguese population with pulmonary tuberculosis. **Rev Port Pneumol**, v.18, n.2, Mar, p.72-79. 2012.

CASCORBI, I., DRAKOULIS, N., BROCKMOLLER, J., MAURER, A., SPERLING, K. e ROOTS, I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. **Am J Hum Genet**, v.57, n.3, Sep, p.581-592. 1995.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.55, p.11-76. 2006.

CEYHAN, I., SIMSEK, H. e TARHAN, G. [Comparison and evaluation of Lowenstein-Jensen medium and 2% Ogawa medium for the diagnosis of tuberculosis]. **Mikrobiyol Bul**, v.46, n.1, Jan, p.33-38. 2012.

CHAMORRO, J. G., CASTAGNINO, J. P., MUSELLA, R. M., NOGUERAS, M., ARANDA, F. M., FRIAS, A., VISCA, M., AIDAR, O., PERES, S. e DE LARRANAGA, G. F. Sex, ethnicity, and slow acetylator profile are the major causes of hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs. **J Gastroenterol Hepatol**, v.28, n.2, Feb, p.323-328. 2013.

CHEN, B., LI, J. H., XU, Y. M., WANG, J. e CAO, X. M. The influence of NAT2 genotypes on the plasma concentration of isoniazid and acetylisoniazid in Chinese pulmonary tuberculosis patients. **Clin Chim Acta**, v.365, n.1-2, Mar, p.104-108. 2006.

CROFTON, J. e MITCHISON, D. A. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. **Br Med J**, v.2, n.4588, Dec 11, p.1009-1015. 1948.

DAVIDSON, L. A. e TAKAYAMA, K. Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in Mycobacterium tuberculosis H37Ra. **Antimicrob Agents Chemother**, v.16, n.1, Jul, p.104-105. 1979.

DEGUCHI, T., MASHIMO, M. e SUZUKI, T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. **J Biol Chem**, v.265, n.22, Aug 5, p.12757-12760. 1990.

DICKINSON, D. S., BAILEY, W. C., HIRSCHOWITZ, B. I., SOONG, S. J., EIDUS, L. e HODGKIN, M. M. Risk factors for isoniazid (INH)-induced liver dysfunction. **J Clin Gastroenterol**, v.3, n.3, Sep, p.271-279. 1981.

DIETZE, R., TEIXEIRA, L., ROCHA, L. M., PALACI, M., JOHNSON, J. L., WELLS, C., ROSE, L., EISENACH, K. e ELLNER, J. J. Safety and bactericidal activity of rifalazil in patients with pulmonary tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.7, Jul, p.1972-1976. 2001.

DONALD, P. R., SIRGEL, F. A., BOTHA, F. J., SEIFART, H. I., PARKIN, D. P., VANDENPLAS, M. L., VAN DE WAL, B. W., MARITZ, J. S. e MITCHISON, D. A. The early bactericidal activity of isoniazid related to its dose size in pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, n.3 Pt 1, Sep, p.895-900. 1997.

DONALD, P. R., SIRGEL, F. A., VENTER, A., PARKIN, D. P., SEIFART, H. I., VAN DE WAL, B. W., WERELY, C., VAN HELDEN, P. D. e MARITZ, J. S. The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid. **Clin Infect Dis**, v.39, n.10, Nov 15, p.1425-1430. 2004.

ELLARD, G. A. The potential clinical significance of the isoniazid acetylator phenotype in the treatment of pulmonary tuberculosis. **Tubercle**, v.65, n.3, Sep, p.211-227. 1984.

EVANS, D. A., MANLEY, K. A. e MC, KUSICK VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. **Br Med J**, v.2, n.5197, Aug 13, p.485-491. 1960.

FOX, W., ELLARD, G. A. e MITCHISON, D. A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.3, n.10 Suppl 2, Oct, p.S231-279. 1999.

FRETLAND, A. J., LEFF, M. A., DOLL, M. A. e HEIN, D. W. Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. **Pharmacogenetics**, v.11, n.3, Apr, p.207-215. 2001.

GARBE, T. R., HIBLER, N. S. e DERETIC, V. Isoniazid induces expression of the antigen 85 complex in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, n.7, Jul, p.1754-1756. 1996.

GOPI, P. G., CHANDRASEKARAN, V., SUBRAMANI, R., SANTHA, T., THOMAS, A., SELVAKUMAR, N. e NARAYANAN, P. R. Association of conversion & cure with initial smear grading among new smear positive pulmonary tuberculosis patients treated with Category I regimen. **Indian J Med Res**, v.123, n.6, Jun, p.807-814. 2006.

GRANT, D. M., HUGHES, N. C., JANEZIC, S. A., GOODFELLOW, G. H., CHEN, H. J., GAEDIGK, A., YU, V. L. e GREWAL, R. Human acetyltransferase polymorphisms. **Mutat Res**, v.376, n.1-2, May 12, p.61-70. 1997.

GULER, M., UNSAL, E., DURSUN, B., AYDLN, O. e CAPAN, N. Factors influencing sputum smear and culture conversion time among patients with new case pulmonary tuberculosis. **Int J Clin Pract**, v.61, n.2, Feb, p.231-235. 2007.

GUMBO, T., LOUIE, A., LIU, W., BROWN, D., AMBROSE, P. G., BHAVNANI, S. M. e DRUSANO, G. L. Isoniazid bactericidal activity and resistance emergence: integrating pharmacodynamics and pharmacogenomics to predict efficacy in different ethnic populations. *Antimicrob Agents Chemother*, v.51, n.7, Jul, p.2329-2336. 2007.

A haplotype map of the human genome. *Nature*, v.437, n.7063, Oct 27, p.1299-1320. 2005.

HEIN, D. W. e DOLL, M. A. Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenomics*, v.13, n.1, Jan, p.31-41. 2012.

HOLDINESS, M. R. Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs. *Clin Pharmacokinet*, v.9, n.6, Nov-Dec, p.511-544. 1984.

HORITA, N., MIYAZAWA, N., YOSHIYAMA, T., KOJIMA, R., OMORI, N., INOUE, M., KANEKO, T. e ISHIGATSUBO, Y. The presence of pretreatment cavitations and the bacterial load on smears predict tuberculosis infectivity negative conversion judged on sputum smear or culture. *Intern Med*, v.51, n.24, p.3367-3372. 2012.

HUANG, Y. S., CHERN, H. D., SU, W. J., WU, J. C., LAI, S. L., YANG, S. Y., CHANG, F. Y. e 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, Apr, p.883-889. 2002.

HUGHES, H. B. On the metabolic fate of isoniazid. *J Pharmacol Exp Ther*, v.109, n.4, Dec, p.444-452. 1953.

HUGHES, H. B., BIEHL, J. P., JONES, A. P. e SCHMIDT, L. H. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc*, v.70, n.2, Aug, p.266-273. 1954.

The International HapMap Project. *Nature*, v.426, n.6968, Dec 18, p.789-796. 2003.

JENNEY, E. H. e PFEIFFER, C. C. The convulsant effect of hydrazides and the antidotal effect of anticonvulsants and metabolites. *J Pharmacol Exp Ther*, v.122, n.1, Jan, p.110-123. 1958.

JINDANI, A., ABER, V. R., EDWARDS, E. A. e MITCHISON, D. A. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, v.121, n.6, Jun, p.939-949. 1980.

JINDANI, A., DORE, C. J. e MITCHISON, D. A. Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days. *Am J Respir Crit Care Med*, v.167, n.10, May 15, p.1348-1354. 2003.

JOHNSON, J. D., HAND, W. L., FRANCIS, J. B., KING-THOMPSON, N. e CORWIN, R. W. Antibiotic uptake by alveolar macrophages. *J Lab Clin Med*, v.95, n.3, Mar, p.429-439. 1980.

JOHNSON, J. L., HADAD, D. J., BOOM, W. H., DALEY, C. L., PELOQUIN, C. A., EISENACH, K. D., JANKUS, D. D., DEBANNE, S. M., CHARLEBOIS, E. D., MACIEL, E., PALACI, M. e DIETZE, R. Early and extended early bactericidal activity of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.10, n.6, Jun, p.605-612. 2006.

KANT, S., MAURYA, A. K., KUSHWAHA, R. A., NAG, V. L. e PRASAD, R. Multi-drug resistant tuberculosis: an iatrogenic problem. **Biosci Trends**, v.4, n.2, Apr, p.48-55. 2010.

KIRCHHEINER, J., FUHR, U. e BROCKMOLLER, J. Pharmacogenetics-based therapeutic recommendations--ready for clinical practice? **Nat Rev Drug Discov**, v.4, n.8, Aug, p.639-647. 2005.

KITA, T., TANIGAWARA, Y., CHIKAZAWA, S., HATANAKA, H., SAKAEDA, T., KOMADA, F., IWAKAWA, S. e OKUMURA, K. N-Acetyltransferase2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients. **Biol Pharm Bull**, v.24, n.5, May, p.544-549. 2001.

LAWN, S. D. e ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **Lancet**, v.378, n.9785, Jul 2, p.57-72. 2011.

LAWSON, L., THACHER, T. D., YASSIN, M. A., ONUOHA, N. A., USMAN, A., EMENYONU, N. E., SHENKIN, A., DAVIES, P. D. e CUEVAS, L. E. Randomized controlled trial of zinc and vitamin A as co-adjuvants for the treatment of pulmonary tuberculosis. **Trop Med Int Health**, v.15, n.12, Dec, p.1481-1490. 2010.

LEE, J. J., SUO, J., LIN, C. B., WANG, J. D., LIN, T. Y. e TSAI, Y. C. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.7, n.6, Jun, p.569-574. 2003.

LI, N. e STEPHENS, M. Modeling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. **Genetics**, v.165, n.4, Dec, p.2213-2233. 2003.

MACKANESS, G. B. e SMITH, N. The bactericidal action of isoniazid, streptomycin and terramycin on extracellular and intracellular tubercle bacilli. **Am Rev Tuberc**, v.67, n.3, Mar, p.322-340. 1953.

MANDELL, G. L. e PETRI, W. A. Antimicrobial agents. The Pharmacological Basis of Therapeutics, p.1155-1159. 1996.

MATAS, N., THYGESEN, P., STACEY, M., RISCH, A. e SIM, E. Mapping AAC1, AAC2 and AACP, the genes for arylamine N-acetyltransferases, carcinogen metabolising enzymes on human chromosome 8p22, a region frequently deleted in tumours. **Cytogenet Cell Genet**, v.77, n.3-4, p.290-295. 1997.

MCCLATCHY, J. K. Mechanism of Action of Isoniazid on Mycobacterium bovis Strain BCG. **Infect Immun**, v.3, n.4, Apr, p.530-534. 1971.

MDLULI, K., SWANSON, J., FISCHER, E., LEE, R. E. e BARRY, C. E., 3RD. Mechanisms involved in the intrinsic isoniazid resistance of *Mycobacterium avium*. **Mol Microbiol**, v.27, n.6, Mar, p.1223-1233. 1998.

MEYER, H. e MALLY, J. On hydrazine derivatives of pyridine carbonic acids. **M Schr. Chem.**, v.33, p.393-414. 1912.

MITCHELL, R. S., RIEMENSNIER, D. K., HARSCH, J. R., and BELL, J. C. New information on the clinical implications of individual variations in the metabolic handling of antituberculous drugs, particularly isoniazida. In: **Transactions of the 17th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis**. Memphis, Tenn, vol.17, p.77. 1958.

MITCHISON, D. A. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.4, n.9, Sep, p.796-806. 2000.

MITCHISON, D. S. Titration of strains of tubercle bacilli against isoniazid. **Lancet**, v.2, n.6740, Nov 1, p.858-860. 1952.

OHNO, M., YAMAGUCHI, I., YAMAMOTO, I., FUKUDA, T., YOKOTA, S., MAEKURA, R., ITO, M., YAMAMOTO, Y., OGURA, T., MAEDA, K., KOMUTA, K., IGARASHI, T. e AZUMA, J. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.4, n.3, Mar, p.256-261. 2000.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Tratamento da tuberculose: linhas orientadoras para programas nacionais. Lisboa, 2006.

ONYEBUJOH, P., ZUMLA, A., RIBEIRO, I., RUSTOMJEE, R., MWABA, P., GOMES, M. e GRANGE, J. M. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. **Bull World Health Organ**, v.83, n.11, Nov, p.857-865. 2005.

ORENSTEIN, E. W., BASU, S., SHAH, N. S., ANDREWS, J. R., FRIEDLAND, G. H., MOLL, A. P., GANDHI, N. R. e GALVANI, A. P. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.3, Mar, p.153-161. 2009.

PAABO, S. The mosaic that is our genome. **Nature**, v.421, n.6921, Jan 23, p.409-412. 2003.

PALACI, M., DIETZE, R., HADAD, D. J., RIBEIRO, F. K., PERES, R. L., VINHAS, S. A., MACIEL, E. L., DO VALLE DETTONI, V., HORTER, L., BOOM, W. H., JOHNSON, J. L. e EISENACH, K. D. Cavitary disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.45, n.12, Dec, p.4064-4066. 2007.

PALOMINO, J. C. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v.12, n.3, May, p.172-178. 2006.

PALOMINO, J. C., LEAO, S. C. e RITACCO, V. From basic science to patient care. **Tuberculosis** 2007, p.687p. 2007.

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

PARKIN, D. P., VANDENPLAS, S., BOTHA, F. J., VANDENPLAS, M. L., SEIFART, H. I., VAN HELDEN, P. D., VAN DER WALT, B. J., DONALD, P. R. e VAN JAARSVELD, P. P. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.155, n.5, May, p.1717-1722. 1997.

PAYTON, M., AUTY, R., DELGODA, R., EVERETT, M. e SIM, E. Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. **J Bacteriol**, v.181, n.4, Feb, p.1343-1347. 1999.

PERETTI, E., KARLAGANIS, G. e LAUTERBURG, B. H. Acetylation of acetylhydrazine, the toxic metabolite of isoniazid, in humans. Inhibition by concomitant administration of isoniazid. **J Pharmacol Exp Ther**, v.243, n.2, Nov, p.686-689. 1987.

RANA, S. V., OLA, R. P., SHARMA, S. K., ARORA, S. K., SINHA, S. K., PANDHI, P. e SINGH, K. Comparison between acetylator phenotype and genotype polymorphism of n-acetyltransferase-2 in tuberculosis patients. **Hepatol Int**, Aug 25. 2011.

REDON, R., ISHIKAWA, S., FITCH, K. R., FEUK, L., PERRY, G. H., ANDREWS, T. D., FIEGLER, H., SHAPERO, M. H., CARSON, A. R., CHEN, W., CHO, E. K., DALLAIRE, S., FREEMAN, J. L., GONZALEZ, J. R., GRATACOS, M., HUANG, J., KALAITZOPOULOS, D., KOMURA, D., MACDONALD, J. R., MARSHALL, C. R., MEI, R., MONTGOMERY, L., NISHIMURA, K., OKAMURA, K., SHEN, F., SOMERVILLE, M. J., TCHINDA, J., VALSESIA, A., WOODWARK, C., YANG, F., ZHANG, J., ZERJAL, T., ZHANG, J., ARMENGOL, L., CONRAD, D. F., ESTIVILL, X., TYLER-SMITH, C., CARTER, N. P., ABURATANI, H., LEE, C., JONES, K. W., SCHERER, S. W. e HURLES, M. E. Global variation in copy number in the human genome. **Nature**, v.444, n.7118, Nov 23, p.444-454. 2006.

REICH, D. E., GABRIEL, S. B. e ALTSHULER, D. Quality and completeness of SNP databases. **Nat Genet**, v.33, n.4, Apr, p.457-458. 2003.

RILEY, L.W. Isoniazid Chemistry, Metabolism, and Mechanism of Action. **Tuberculosis**, p.p.763-771. 1996.

ROBITZEK, E. H., SEILKOFF, I. J. e ORNSTEIN, G. G. Chemotherapy of human tuberculosis with hydrazine derivatives of isonicotinic acid. (Preliminary report of representative cases.). **Quart. Bull., Sea View Hosp.**, v.13, p.27. 1952.

RODRIGUES, L., BARRETO, M., KRAMER, M. e BARRADAS BARATA RDE, C. [Brazilian response to tuberculosis: context, challenges and perspectives]. **Rev Saude Publica**, v.41 Suppl 1, Sep, p.1-3. 2007.

ROZWARSKI, D. A., GRANT, G. A., BARTON, D. H., JACOBS, W. R., JR. e SACCHETTINI, J. C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.279, n.5347, Jan 2, p.98-102. 1998.

SABBAGH, A. e DARLU, P. Inferring haplotypes at the NAT2 locus: the computational approach. **BMC Genet**, v.6, p.30. 2005.

SANDY, J., HOLTON, S., FULLAM, E., SIM, E. e NOBLE, M. Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine N-acetyltransferase protein from *Mycobacterium smegmatis*. **Protein Sci**, v.14, n.3, Mar, p.775-782. 2005.

SANGER, F., NICKLEN, S. e COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.74, n.12, Dec, p.5463-5467. 1977.

SBPT. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J Bras Pneumol**. v.35, p.1018-1048. 2009.

SEIFART, H. I., PARKIN, D. P., BOTHA, F. J., DONALD, P. R. e VAN DER WALT, B. J. Population screening for isoniazid acetylator phenotype. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v.10, n.2, Mar-Apr, p.127-134. 2001.

SELIKOFF, I. J. e ROBITZEK, E. H. Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid. **Dis. Chest**, v.21, p.385. 1952.

SEVERINO, G. e DEL ZOMPO, M. Adverse drug reactions: role of pharmacogenomics. **Pharmacol Res**, v.49, n.4, Apr, p.363-373. 2004.

SHAMPUTA, I. C., JUGHELI, L., SADRADZE, N., WILLERY, E., PORTAELS, F., SUPPLY, P. e RIGOUTS, L. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. **Respir Res**, v.7, p.99. 2006.

SIM, E., LACK, N., WANG, C. J., LONG, H., WESTWOOD, I., FULLAM, E. e KAWAMURA, A. Arylamine N-acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. **Toxicology**, v.254, n.3, Dec 30, p.170-183. 2008.

SIM, E., PAYTON, M., NOBLE, M. e MINCHIN, R. An update on genetic, structural and functional studies of arylamine N-acetyltransferases in eucaryotes and procaryotes. **Hum Mol Genet**, v.9, n.16, Oct, p.2435-2441. 2000.

SIRGEL, F. A., BOTHA, F. J., PARKIN, D. P., VAN DE WAL, B. W., DONALD, P. R., CLARK, P. K. e MITCHISON, D. A. The early bactericidal activity of rifabutin in patients with pulmonary tuberculosis measured by sputum viable counts: a new method of drug assessment. **J Antimicrob Chemother**, v.32, n.6, Dec, p.867-875. 1993.

SIRGEL, F. A., DONALD, P. R., ODHIAMBO, J., GITHUI, W., UMAPATHY, K. C., PARAMASIVAN, C. N., TAM, C. M., KAM, K. M., LAM, C. W., SOLE, K. M. e MITCHISON, D. A. A multicentre study of the early bactericidal activity of anti-tuberculosis drugs. **J Antimicrob Chemother**, v.45, n.6, Jun, p.859-870. 2000.

SLAYDEN, R. A. e BARRY, C. E., 3RD. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. **Microbes Infect**, v.2, n.6, May, p.659-669. 2000.

STEPHENS, M. e DONNELLY, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **Am J Hum Genet**, v.73, n.5, Nov, p.1162-1169. 2003.

SUNAHARA, S., URANOM e OGAWAM. Genetical and geographic studies on isoniazid inactivation. **Science**, v.134, n.3489, Nov 10, p.1530-1531. 1961.

TAKAYAMA, K., ARMSTRONG, E. L. e DAVID, H. L. Restoration of mycolate synthetase activity in Mycobacterium tuberculosis exposed to isoniazid. **Am Rev Respir Dis**, v.110, n.1, Jul, p.43-48. 1974.

TAKAYAMA, K., KEITH, A. D. e SNIPES, W. Effect of isoniazid on the protoplasmic viscosity in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.7, n.1, Jan, p.22-24. 1975a.

TAKAYAMA, K., SCHNOES, H. K., ARMSTRONG, E. L. e BOYLE, R. W. Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. **J Lipid Res**, v.16, n.4, Jul, p.308-317. 1975b.

TAKAYAMA, K., WANG, L. e DAVID, H. L. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.2, n.1, Jul, p.29-35. 1972.

TAKAYAMA, K., WANG, L. e MERKAL, R. S. Scanning electron microscopy of the H37Ra strain of Mycobacterium tuberculosis exposed to isoniazid. **Antimicrob Agents Chemother**, v.4, n.1, Jul, p.62-65. 1973.

TEIXEIRA, R. L., MIRANDA, A. B., PACHECO, A. G., LOPES, M. Q., FONSECA-COSTA, J., RABAHI, M. F., MELO, H. M., KRITSKI, A. L., MELLO, F. C., SUFFYS, P. N. e SANTOS, A. R. Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. **Mutat Res**, v.624, n.1-2, Nov 1, p.31-40. 2007.

TEIXEIRA, R. L., MORATO, R. G., CABELLO, P. H., MUNIZ, L. M., MOREIRA ADA, S., KRITSKI, A. L., MELLO, F. C., SUFFYS, P. N., MIRANDA, A. B. e SANTOS, A. R. Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, n.6, Sep, p.716-724. 2011.

TEIXEIRA, R. L., SILVA, F. P., JR., SILVEIRA, A. R., CABELLO, P. H., MENDONCA-LIMA, L., RABAHI, M. F., KRITSKI, A. L., MELLO, F. C., SUFFYS, P. N., DE MIRANDA, A. B. e SANTOS, A. R. Sequence analysis of NAT2 gene in Brazilians: identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. **Mutat Res**, v.683, n.1-2, Jan 5, p.43-49. 2010.

THYGESEN, P., RISCH, A., STACEY, M., FAKIS, G., GIANNOULIS, F., TAKLE, L., KNOWLES, M. e SIM, E. Genes for human arylamine N-acetyltransferases in relation to loss of the short arm of chromosome 8 in bladder cancer. **Pharmacogenetics**, v.9, n.1, Feb, p.1-8. 1999.

TIMBRELL, J. A., MITCHELL, J. R., SNODGRASS, W. R. e NELSON, S. D. Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, v.213, n.2, May, p.364-369. 1980.

TOMALIK-SCHARTE, D., LAZAR, A., FUHR, U. e KIRCHHEINER, J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. **Pharmacogenomics J**, v.8, n.1, Feb, p.4-15. 2008.

TSUKAMURA, M. e TSUKAMURA, S. Isotopic Studies on the Effect of Isoniazid on Protein Synthesis of Mycobacteria. **Jpn J Tuberc Chest Dis**, v.11, Dec, p.14-27. 1963.

UPTON, A., JOHNSON, N., SANDY, J. e SIM, E. Arylamine N-acetyltransferases - of mice, men and microorganisms. **Trends Pharmacol Sci**, v.22, n.3, Mar, p.140-146. 2001.

VAN CREVEL, R., OTTENHOFF, T. H. e VAN DER MEER, J. W. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n.2, Apr, p.294-309. 2002.

VATSIS, K. P., MARTELL, K. J. e WEBER, W. W. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.14, Jul 15, p.6333-6337. 1991.

VEEN, J. Drug resistant tuberculosis: back to sanatoria, surgery and cod-liver oil? **Eur Respir J**, v.8, n.7, Jul, p.1073-1075. 1995.

VISSER, M. E., STEAD, M. C., WALZL, G., WARREN, R., SCHOMAKER, M., GREWAL, H. M., SWART, E. C. e MAARTENS, G. Baseline predictors of sputum culture conversion in pulmonary tuberculosis: importance of cavities, smoking, time to detection and W-Beijing genotype. **PLoS One**, v.7, n.1, p.e29588. 2012.

VON GROLL, A., MARTIN, A., STEHR, M., SINGH, M., PORTAELS, F., DA SILVA, P. E. e PALOMINO, J. C. Fitness of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. **PLoS One**, v.5, n.4, p.e10191. 2010.

WALLIS, R. S., DOHERTY, T. M., ONYEBUJOH, P., VAHEDI, M., LAANG, H., OLESEN, O., PARIDA, S. e ZUMLA, A. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.3, Mar, p.162-172. 2009.

WALLIS, R. S., PATIL, S., CHEON, S. H., EDMONDS, K., PHILLIPS, M., PERKINS, M. D., JOLOBA, M., NAMALE, A., JOHNSON, J. L., TEIXEIRA, L., DIETZE, R., SIDDIQI, S., MUGERWA, R. D., EISENACH, K. e ELLNER, J. J. Drug tolerance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, n.11, Nov, p.2600-2606. 1999.

WANG, J. Y., LEE, L. N., YU, C. J., CHIEN, Y. J. e YANG, P. C. Factors influencing time to smear conversion in patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. **Respirology**, v.14, n.7, Sep, p.1012-1019. 2009.

WEBER, W. W. e HEIN, D. W. Clinical pharmacokinetics of isoniazid. **Clin Pharmacokinet**, v.4, n.6, Nov-Dec, p.401-422. 1979.

WEBER, W. W., HEIN, D. W., LITWIN, A. e LOWER, G. M., JR. Relationship of acetylator status to isoniazid toxicity, lupus erythematosus, and bladder cancer. **Fed Proc**, v.42, n.14, Nov, p.3086-3097. 1983.

Website oficial para consenso de nomenclatura do gene arilamina N-acetiltransferase humana. http://louisville.edu/medschool/pharmacology/consensus-human-arylamine-n-acetyltransferase-gene-nomenclature/nat_pdf_files/Human_NAT2_alleles.pdf> Acesso em: 30 de jan. 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2012**. 2012a. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 10 de jan. 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tuberculosis**. Out, 2012b. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>>. Acesso em: 10 de jan. 2013.

WINDER, F. G., COLLINS, P. e ROONEY, S. A. Effects of isoniazid on mycolic acid synthesis in Mycobacterium tuberculosis and on its cell envelope. **Biochem J**, v.117, n.2, Apr, p.27P. 1970.

WINDER, F. G. e ROONEY, S. A. The effects of isoniazid on the carbohydrates of Mycobacterium tuberculosis BCG. **Biochem J**, v.117, n.2, Apr, p.355-368. 1970.

XU, C. F., LEWIS, K., CANTONE, K. L., KHAN, P., DONNELLY, C., WHITE, N., CROCKER, N., BOYD, P. R., ZAYKIN, D. V. e PURVIS, I. J. Effectiveness of computational methods in haplotype prediction. **Hum Genet**, v.110, n.2, Feb, p.148-156. 2002.

ZHANG, Y., HEYM, B., ALLEN, B., YOUNG, D. e COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. **Nature**, v.358, n.6387, Aug 13, p.591-593. 1992.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO BIOMÉDICO
NÚCLEO DE DOENÇAS INFECCIOSAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
CONTATO DOMICILIAR

TÍTULO DO ESTUDO: Estudo sobre acetilação da isoniazida em pacientes com tuberculose e da sua implicação na redução ou eliminação da carga bacilar no escarro

Nome do Voluntário: _____

Introdução

Você foi convidado a participar de uma pesquisa. Os doutores responsáveis por este estudo são o Dr. Moisés Palaci e o Dr. Reynaldo Dietze.

Este documento é um formulário de consentimento que explica tudo sobre o estudo que será feito e fornece as informações necessárias para você decidir se vai participar do estudo ou não. Portanto leia cuidadosamente e pergunte o que julgar necessário. Se você concordar em participar, será convidado a assinar este formulário. Você receberá uma cópia do mesmo para guardar.

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque participou previamente de um dos três estudos citados abaixo, realizados no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES):

- “Estudo fase I, aberto, randomizado, para avaliação da atividade bactericida precoce de múltiplas doses da Linezolida, Gatifloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina em pacientes adultos não infectados pelo HIV com tuberculose

pulmonar bacilífera e sem tratamento prévio para a doença". Registro CONEP: 7917.

- "Estudo prospectivo, multicêntrico, controlado, randomizado, para a avaliação de esquema encurtado do tratamento padrão da tuberculose de 6 meses para 4 meses, em pacientes HIV negativos, infectados com cepas sensíveis às drogas, sem doença cavitária e com cultura negativa no segundo mês de tratamento". Registro CONEP: 3319.
- "Análise do potencial preditivo e marcadores imunológicos e microbiológicos na avaliação da resposta terapêutica anti-tuberculose em pacientes adultos HIV negativos com baciloscopia positiva e baciloscopia negativa para tuberculose pulmonar". Registro CONEP: 1491.

Por que este estudo está sendo feito?

Existem diferenças entre as pessoas para a metabolização da isoniazida, que é um medicamento utilizado para o tratamento da tuberculose. Algumas pessoas permanecem com a droga no sangue por mais tempo do que outras. Quanto mais tempo a droga permanecer no sangue, maior a chance de matar as bactérias que causam a tuberculose, porém maior é a probabilidade de surgirem reações adversas. Espera-se que um melhor entendimento deste assunto irá ajudar cientistas a descobrirem tratamentos para tuberculose que sejam mais eficazes, mais curtos e com menos eventos adversos.

Como funciona o estudo?

O objetivo do estudo é relacionar o tipo de acetilação do indivíduo com o tempo de negativação da carga bacilar de escarro de pacientes em vigência de tratamento para tuberculose.

O que vão me pedir para fazer?

Se você concordar em participar do estudo, vão lhe pedir para assinar este formulário de consentimento. Solicita-se a permissão para utilização de sua amostra de escarro que está armazenada no banco de escarros em freezer a -70°C do NDI-UFES. Além disso, solicita-se a permissão para a coleta de 3mL de sangue. Este

sangue e este escarro serão utilizados para realização da análise genética que identificará o seu perfil de acetilação para isoniazida.

Quem pode participar do estudo?

Para você participar deste estudo, você tem que ter participado dos estudos previamente citados e estar em acordo com o termo de consentimento.

Quanto tempo vai durar o meu envolvimento com o estudo?

O seu envolvimento com o estudo terminará assim que a amostra de sangue for coletada pelo enfermeiro treinado.

Existem riscos?

Não existem riscos para o paciente já que você obteve a cura no final do tratamento o qual foi submetido e as amostras de sangue e escarro serão utilizadas com o único objetivo de análise do perfil de acetilação para isoniazida, o que não ocasionará nenhum malefício para sua saúde físico-psicológica. O procedimento de coleta de sangue pode lhe causar dano físico. Os riscos de ter o seu sangue colhido são dor, hematoma, desconforto temporário e raramente infecção local.

Existem benefícios?

O que for descoberto neste estudo ajudará o entendimento do surgimento de efeitos colaterais devido ao uso da droga.

Há algum custo para participar do estudo? Vou ser pago?

Não há nenhum custo para você participar do estudo. Não haverá benefícios financeiros.

E quanto à confidencialidade?

Todos os seus dados serão mantidos sob confidencialidade pela equipe do estudo. Se você entrar no estudo, você receberá números de código. Esses números de código serão usados no lugar do seu nome para identificar sua amostra e qualquer informação que for obtida sobre você. Manteremos uma ligação de identidade com o número de código do estudo. Esta ligação só será conhecida pelo coordenador do

estudo e não será revelada, a menos que seja exigido por lei. Quando este estudo se tornar público, você não será identificado pelo nome.

Além da equipe do estudo, é preciso permitir que pessoas dos seguintes lugares vejam seus registros do estudo:

- Universidade Federal do Espírito Santo – UFES,
- Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes - HUCAM

Quais são os meus direitos?

É sua a escolha de participar deste estudo ou não. Você pode sair do estudo no momento em que quiser. Caso você decida participar do estudo, você terá acesso garantido a seus dados genéticos quando estes estiverem disponíveis e pode verificá-los assim que tiver interesse.

Você também terá o direito de retirá-los dos bancos de armazenamento dos dados a qualquer momento.

Com quem posso entrar em contato se eu tiver perguntas?

Se você tiver perguntas sobre a participação neste estudo, ou achar que sofreu danos, você pode entrar em contato com:

Maria José Chiabai

Pesquisadora responsável

Núcleo de Doenças Infecciosas – NDI

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Av. Marechal Campos, No. 1468. Vitória, ES

Tel: 27-3335-7210

Se você tiver perguntas sobre seus direitos como voluntário do estudo, você pode entrar em contato com:

Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes - HUCAM

Tel.: 27-3335-7504

Assinatura do Sujeito:

Li este formulário inteiro, ou o mesmo me foi lido, e o entendi totalmente. Todas as minhas perguntas sobre este formulário ou esta pesquisa foram respondidas satisfatoriamente. Concordo em participar desta pesquisa.

Sujeito:

Assinatura (ou impressão digital)

Nome do Sujeito (legível)

Data**Testemunha:** (Exigida SOMENTE se o sujeito não souber ler.)

Li este formulário inteiro para o sujeito. Acredito que ele ou ela o entendeu totalmente.

Assinatura da Testemunha

Nome da Testemunha (legível)

Data**Assinatura do Investigador ou Pessoa Responsável:**

Expliquei os objetivos deste estudo ao voluntário. Tenho plena convicção de que ele/ela entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação no estudo.

Assinatura do Investigador
ou seu representante

Nome do Investigador
ou seu representante (legível)

Data