

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANA JACQUELINE COELHO RODRIGUES

FATORES ASSOCIADOS ÀS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE
FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANA JACQUELINE COELHO RODRIGUES

FATORES ASSOCIADOS ÀS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE
FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial de avaliação para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães

MANAUS

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R696f Rodrigues, Ana Jacqueline Coelho
Fatores associados às concentrações séricas de fármacos utilizados no tratamento da Tuberculose / Ana Jacqueline Coelho Rodrigues. 2016
102 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Igor Rafael dos Santos Magalhães
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Níveis terapêuticos. 2. Fármacos antituberculose. 3. Monitorização terapêutica de fármacos. 4. Farmacogenética. I. Magalhães, Igor Rafael dos Santos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANA JACQUELINE COELHO RODRIGUES

FATORES ASSOCIADOS ÀS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE
FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal
do Amazonas, como parte do requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 31 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães – Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Profª Drª. Aya Sadahiro – Membro
Universidade Federal do Amazonas

Profª Drª. Marlúcia da Silva Garrido – Membro
Fundação em Vigilância em Saúde do Amazonas

Aos meus pais, Ray e Lima, pelo incentivo e apoio de sempre e por sustentarem e compreenderem minha ausência em busca de realização pessoal.

A minha irmã, Deyse Caroline, pela força, carinho e compreensão.

A minha avó Maria Rodrigues, dedico mais essa conquista.

Sem os valores, o apoio e o amor incondicional de vocês, nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida e por sempre estar me sustentando, proporcionando saúde para prosseguir essa jornada magnífica que é a vida. Muito obrigada, Pai!

Aos meus pais, **Maria e Raimundo de Lima**, que me ensinaram os caminhos dos estudos e o prazer em aprender. Além de me amarem incondicionalmente, mesmo nas minhas ausências e indelicadezas devido à pesquisa. Amo vocês!

À toda **minha família**, tios e tias, primos e primas, e especialmente minha avó **Maria Rodrigues** e minha irmã **Deyse Caroline**, pela compreensão, ajuda e carinho em todas as horas.

Ao **Prof. Igor Rafael dos Santos Magalhães**, pela oportunidade de aprendizado e aprimoramento a mim ofertada, além da paciência para mostrar o caminho da pesquisa. Minha profunda gratidão!

Ao meu estimado grupo de pesquisa **NePK**, em especial as amigas **Edna Márcia, Karina Gabriella e Talita Heleny**, pela parceria, apoio e colo quando necessário! Além das adoráveis reuniões sejam de trabalho ou de comemorações! Muito obrigada por tudo!

À Policlínica Cardoso Fontes, por toda a receptividade, contribuição e parceria desde a diretora **Dra. Irineide Assumpção** e demais funcionários, em especial, os amigos do laboratório, a **Dra. Joycenéa Matsuda** e as queridas companheiras, técnicas em enfermagem, **Dulcilene, Elenilda e Katyana**. Minha imensa gratidão!

Ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas-LAC do Hospital Universitário Getúlio Vargas, especialmente à **Dra. Neila Mallman**, por todo suporte prático e também conhecimento ofertado. Meus sinceros agradecimentos!

Aos colegas do Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico – LADETEC da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela parceria, paciência e ensinamentos compartilhados! Em especial aos amigos **Prof. Vinícius Sardela** e **Profa. Carina Anselmo** pela dedicação, colaboração e apoio! Grata, queridos!

Aos parceiros da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), especialmente aos professores **Andréa Tarragô** e **Allyson Guimarães** do laboratório de Genômica 2, os quais se disponibilizaram a ajudar, a ensinar e a esperar comigo as duas horinhas de PCR em tempo real. Valeu, queridos!

Aos queridos professores **José Pereira Neto** e **Marcus Tolentino** pelos conselhos, apoio e conhecimento dividido nas horas mais angustiantes! Agradeço aos mestres!

Aos meus queridos **amigos**, as minhas queridas amigas **SB's** e em especial aos meus queridos companheiros de mestrado, **Flavia Barros, Deborah Braz, Bárbara Salgado e Hygor Halysen**, por estarem presentes durante essa árdua caminhada, por me “aturarem” em momentos de estresse, pelo precioso incentivo e ajuda em todos os momentos.

*Aos amigos da Drogaria Farmabem 07, que em meio a plantões, artigos, clientes e situações avessas, me apoiaram com pensamentos e vibrações positivas. Agradecimento especial aos meus gerentes, **Izanel Calderaro** e **Emerson Cunha**, por permitirem que eu escrevesse e estudasse no local de trabalho! Além deles, quero agradecer às minhas parceiras farmacêuticas **Andréa Olivo** e **Ana Tacha**, que em momentos cruciais, me cobriram em exaustivos plantões! Muito obrigada, amigos!*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, que no âmbito da **Universidade Federal do Amazonas**, me proporcionou a oportunidade de aperfeiçoamento e enriquecimento como profissional.*

*Ao **CNPq** por ter concedido a bolsa de estudos e à **FAPEAM** por custear o projeto.*

A todos as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na minha formação e na conclusão deste trabalho. Obrigada!

RESUMO

Introdução: A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa de alta prevalência no Brasil. Desta forma, o tratamento medicamentoso empregado no país é padronizado pelo Esquema Básico de Tratamento da TB e é constituído por Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol. A ocorrência de baixos níveis terapêuticos desses fármacos no soro é relatada nas mais diversas populações e diversos fatores podem contribuir para este fato. Portanto, este estudo teve como objetivo determinar os fatores associados às concentrações séricas dos fármacos antituberculose, além de determinar fatores sócio demográficas e laboratoriais com esses níveis séricos obtidos em amostras de pacientes atendidos em uma unidade de referência em Manaus.

Materiais e Métodos: Tratou-se de um estudo analítico-observacional de corte transversal. A população de estudo foi composta por pacientes sob tratamento da tuberculose atendidos em uma unidade de referência da cidade de Manaus. As variáveis foram comparadas entre os pacientes com níveis séricos baixos e normais usando o teste do qui-quadrado (χ^2) para variáveis categóricas e teste *t* de Student para variáveis contínuas. Para todos os testes realizados neste estudo, o nível de significância adotado foi de 0,05. **Resultados:** Dos 222 pacientes, 40,9% dos pacientes apresentaram níveis séricos reduzidos para um dos fármacos testados, sendo que as prevalências de baixos níveis terapêuticos mais expressivas foram para Isoniazida (60,8%) e Rifampicina (58,6%). Foi verificada associação de solteiros com baixas concentrações séricas de Isoniazida ($p=0,044$), de pessoas com ensino médio/superior ($p=0,028$) e de etilistas ($p=0,038$). Além disso, no caso da Rifampicina, foi verificada associação de pessoas com escolaridade ensino médio/superior e baixos níveis terapêuticos deste fármaco ($p=0,063$). Foi realizada análise de variância e não houve associação dos genótipos de NAT2 e as concentrações séricas com significância estatística ($p<0,05$). **Conclusão:** A ocorrência de baixas concentrações séricas dos fármacos de primeira linha utilizados para o tratamento da TB foi constatada na população em estudo. Estudos adicionais devem ser realizados para avaliar o impacto da farmacogenética e da adesão ao tratamento nestes resultados, bem como investigar a influência das baixas concentrações no desfecho do tratamento.

Palavras-chave: Níveis terapêuticos, Fármacos antituberculose, Monitorização terapêutica de fármacos, Farmacogenética.

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis (TB) is an infectious disease of high prevalence in Brazil. Thus, drug treatment used in the country is standardized by the TB treatment Basic Scheme and consists of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol. The occurrence of low therapeutic levels of these drugs is reported in several people and many factors may contribute to this outcome. Therefore, this study aimed to determine the serum concentrations of antituberculosis drugs, and relating sociodemographic and laboratory variables with the levels obtained in samples from patients treated at a referral center in Manaus. **Materials and Methods:** This was an analytical-observational cross-sectional study. The study population consisted of patients under treatment for TB treated at a referral center in the city of Manaus. The variables were compared between patients with low and normal serum using the chi-square test for categorical variables and Student's t test for continuous variables. For all the tests performed in this study, the significance level was 0.05. **Results:** Of 222 patients, 40.9% of patients had reduced serum levels for one of the tested drugs, and the prevalence of low more significant therapeutic levels were to isoniazid (60.8%) and rifampin (58.6%). Singles was found association with low serum concentrations of Isoniazid ($p = 0.044$), people with high school/graduate education ($p = 0.028$) and alcoholics ($p = 0.038$). Furthermore, in the case of Rifampicin, was association of people with a high school/graduate and lower therapeutic drug levels ($p = 0.063$). ANOVA analysis was performed and there was no association of the NAT2 genotypes and the serum concentrations with statistical significance ($p < 0.05$). **Conclusion:** The presence of low concentrations of first-line drugs used to treat TB was found in a significant proportion of the population under study. Additional studies should be conducted to assess the impact of pharmacogenetics and adherence to treatment in these results, as well as to investigate the influence of low concentrations in treatment outcome.

Keywords: Therapeutic levels, Antituberculosis drugs, Therapeutic monitoring of drugs, Pharmacogenetics.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1 – Esquema básico de tratamento da tuberculose.	24
Figura 1– Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.....	26
Figura 2 – Esquema demonstrando os mecanismos de ação dos fármacos do esquema básico de tratamento da Tuberculose	29
Figura 3 – Metabolismo da isoniazida.....	34
Figura 4 – Fluxograma de coleta das amostras.....	47
Figura 5 – Fluxograma de análise das amostras	47
Figura 6 – Cromatogramas representativos das análises realizadas.....	51
Figura 7 – Distribuição das concentrações séricas dos fármacos INH, EB, PZN e RFP encontradas nos pacientes estudados.....	59
Figura 8 – Classificação dos níveis terapêuticos dos fármacos INH, RFP, EB e PZN pertencentes ao DFC utilizado no tratamento da TB.....	62
Figura 9 – Curva de amplificação gênica para o polimorfismo NAT2*12.....	63
Figura 10 – Associação entre os genótipos e as concentrações séricas de INH por ANOVA.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alelos humanos mais frequentes de NAT2 e seus respectivos fenótipos.....	36
Tabela 2 – Faixa terapêutica dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose segundo Peloquin (2002)	48
Tabela 3 – Condições de espectrometria de massas em tandem e faixas de colisão do gás de cada analito empregadas nas análises.....	50
Tabela 4 – Perfil dos pacientes do estudo.....	56
Tabela 5 – Relação entre as características dos pacientes e o nível sérico dos fármacos estudados.....	72
Tabela 6 – Marcadores bioquímicos dos pacientes de acordo com o nível sérico.....	73

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Alb	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
antiTB	Antituberculose
AST	Aspartato aminotransferase
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
caps	cápsula
cp	comprimido
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CIM	concentração inibitória mínima
cMtb	complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CYP	citocromo
DFC	dose fixa combinada
EBT	esquema básico de tratamento
EB	etambutol
GST	glutathione S-transferase
HIF – antiTB	hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose
HIV	vírus da imunodeficiência humana
INH	isoniazida
LHIF – antiTB	lesão hepática induzida por fármacos antituberculose
MS	Ministério da Saúde
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAT	N – acetil transferase
ODM	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCF	Policlínica Cardoso Fontes
PZA	pirazinamida
RFP	rifampicina
RH	esquema rifampicina + isoniazida

RHZE	esquema rifampicina + isoniazida + pirazinamida + etambutol
SIDA	síndrome da Imunodeficiência Humana
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
TB	tuberculose
TB-MDR	tuberculose Multi-Droga Resistente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. Aspectos gerais da tuberculose	19
3.2. A etiopatogenia da tuberculose	21
3.3. Tratamento farmacológico	23
3.4. Fármacos empregados no tratamento padrão da tuberculose.....	25
3.4.1. Isoniazida	25
3.4.2. Rifampicina	27
3.4.3. Pirazinamida.....	28
3.4.4. Etambutol	29
3.5. Os desafios da terapêutica da tuberculose.....	30
3.5.1. A enzima Arilamina N-acetiltransferase 2 (NAT 2).....	34
3.6. Farmacogenômica na tuberculose	38
3.7. Controle terapêutico	40
4. MÉTODOS.....	43
4.1. Desenho do estudo.....	43
4.2. Local de estudo.....	43
4.3. População de estudo	44
4.4. Critérios de inclusão	44
4.5. Critérios de exclusão	45
4.6. Coleta dos dados dos pacientes	45
4.7. Determinação das concentrações séricas dos fármacos nas amostras dos pacientes.....	48
4.8. Análises moleculares	51
4.9. Análise estatística dos dados.....	52
4.10. Aspectos éticos	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

5.1 Caracterização sócio-demográfica e laboratorial	54
5.2 Determinação das concentrações séricas dos fármacos.....	58
5.3 Determinação genotípica	63
5.4 Associação entre fatores sócio-demográficos, laboratoriais, genéticos e concentrações séricas	65
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica causada principalmente pelo microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo aeróbio estrito de crescimento lento, onde os pulmões são o principal alvo, podendo também afetar outros órgãos (LOPES, 2010). Patologicamente, caracteriza-se pela formação de granulomas com necrose caseosa devido à resposta celular no tecido afetado (CAMPOS et al., 2011).

Com o advento das estratégias da Organização Mundial da Saúde (Stop TB e Directly Observed Treatment Short-Course – DOTS), o cenário global da TB teve melhora: o diagnóstico eficaz e o tratamento da doença, no período de 2000 a 2014, salvaram 43 milhões de vidas e a prevalência estimada de TB no ano de 2015 foi 42% menor que em 1990. No entanto, apesar desse panorama, a doença continua sendo prioridade devido à alta prevalência, considerando que no ano de 2014, cerca de 10 milhões de pessoas adoeceram com TB e, dessas, houve ainda a morte de 1,5 milhão de pessoas (BRASIL, 2016).

No tratamento medicamentoso padrão da TB são utilizados os medicamentos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, elencados no Brasil pelo esquema básico de tratamento em uma terapia de no mínimo 6 meses (BRASIL, 2010). Apesar da grande eficácia do esquema terapêutico, determinados pacientes não respondem adequadamente ao tratamento e ocorre o desenvolvimento de cepas resistentes (MAGIS-ESCURRA et al., 2012).

A ineficácia do tratamento verificada em uma parcela da população pode ser decorrente das baixas concentrações séricas, sugerindo que este fato contribua para a falha terapêutica, segundo Song et al. (2007). As baixas concentrações séricas podem ser resultado da variabilidade interindividual na absorção, no metabolismo ou excreção dos fármacos (BURHAN et al., 2013), bem como em diferenças na biodisponibilidade das formulações e comorbidades (SEGOVIA et al., 2013), como o diabetes mellitus (BABALIK et al., 2013).

Segundo a literatura, as baixas concentrações séricas de fármacos antituberculose têm sido associadas com sexo, idade, etilismo, hipoalbuminemia, infecção pelo vírus HIV, dentre outros (UM et al., 2007; BARROSO et al., 2009; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2012).

Além disso, as variações interindividuais podem estar vinculadas aos fatores genéticos, principalmente os polimorfismos genéticos de proteínas e enzimas envolvidas no transporte e metabolismo destes fármacos, como NAT-2, CYP2E1, GMTT/GSTT e SLCB1B1, os quais foram implicados na alteração da disposição cinética destes fármacos em estudos realizados em algumas populações (RAMACHANDRAN & SWAMINATHAN, 2012).

Em virtude da problemática da doença na região Amazônica, no presente estudo, se busca compreender os determinantes das baixas concentrações séricas dos fármacos antituberculose mesmo em pacientes submetidos ao tratamento supervisionado, o que demonstrou haver uma lacuna desse tipo de pesquisa na região. Desta forma, acredita-se que os resultados advindos da pesquisa servirão também para auxiliar a equipe clínica no ajuste de dose dos pacientes que apresentarem níveis séricos considerados insatisfatórios conforme a literatura existente.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Relacionar as variáveis sócio demográficas e laboratoriais com as concentrações séricas dos fármacos antituberculose em amostras de pacientes com diagnóstico de TB atendidos em uma unidade de referência em Manaus.

2.2. Específicos

- Caracterizar o perfil socioeconômico e determinar fatores laboratoriais dos pacientes diagnosticados para TB na unidade de referência;
- Determinar as concentrações séricas de fármacos antituberculose nas amostras destes pacientes;
- Descrever as frequências de polimorfismos genéticos da enzima NAT2 nestes pacientes;
- Investigar a associação entre as variáveis sócio demográficas e laboratoriais encontradas com as concentrações séricas dos fármacos Isoniazida, Pirazinamida, Etambutol e Rifampicina.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos gerais da tuberculose

Em meados de 1900, relatou-se, pela primeira vez, o agente etiológico da tuberculose (TB), *Mycobacterium tuberculosis*, isolado pelo pesquisador Robert Koch, bacilo que ficou também conhecido por bacilo de Koch. Há relatos de 3300 anos atrás na Índia e 2300 anos na China, bem como, na Grécia antiga, a TB era conhecida como “Phthisis” (tísica) e Hipócrates compreendia suas manifestações clínicas (DANIEL, 2006).

No final do século XIX, a cada cinco pessoas, uma desenvolvia a TB e cerca de 60% destas morria. A descoberta do agente etiológico, o tratamento sanitário no início dos anos 1920s e a descoberta de alguns medicamentos como estreptomicina (1947) e isoniazida (1952), além da melhora nas condições socioeconômicas esperanças uma futura eliminação da doença (DOMINGOS, 2003).

Há mais de 50 anos vulnerável ao tratamento farmacológico, a TB permanece uma das doenças transmissíveis mais mortais do mundo. Considerada uma das doenças de existência mais antiga no mundo, a TB impacta significativamente a evolução da humanidade, por ser uma doença desafiadora em termos sanitaristas no mundo todo (TEIXEIRA, 2007). A TB é considerada uma doença negligenciada, relacionada a questões de cunho social e econômico, intimamente ligada ao adensamento populacional e à epidemia da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

No ano de 2014, foram estimados 9,6 milhões de casos novos de TB no mundo, sendo que 5,4 milhões de homens, 3,2 milhões de mulheres e 1 milhão de crianças. O Brasil está na 18ª posição no ranking de carga de tuberculose, o que representa 0,9% dos casos estimados no mundo e corresponde a 33% dos estimados nas Américas (WHO,2015).

Em 2015 foram diagnosticados e registrados 63.189 casos novos de tuberculose no Brasil, sendo que o coeficiente de incidência de TB passou de 38,7/100 mil habitantes em 2006 para 30,9/100 mil hab. em 2015, correspondendo a uma redução de 20,2%, segundo o Boletim Epidemiológico n. 47 da Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2016).

Os coeficientes de mortalidade e incidência tiveram reduções de 38,9% (3,6 para 2,2/100 mil hab.) e 34,1% (51,8 para 34,1/100 mil hab.), respectivamente, de 1990 até 2014. Esses resultados fizeram que o Brasil cumprisse as metas internacionais exigidas. Anualmente, cerca de 70 mil casos novos e 4400 mortes por TB foram registrados entre os anos de 2005 e 2014 (BRASIL, 2016).

Segundo o Ministério da Saúde, há uma heterogeneidade no cálculo do risco de adoecimento por TB nas Unidades da Federação, esse cálculo variou de 10,5/100 mil hab. no Tocantins a 70,1/100 mil hab. no Amazonas, em 2015. As capitais brasileiras no ano de 2015 notificaram 23.161 casos novos de TB, correspondendo a 36,6% do total do país. Manaus se destacou por apresentar coeficiente de incidência de 98,3/100 mil habitantes, o que excede o valor nacional de 30,9/100 mil hab. em mais de 100%, além da capital do Amazonas, na lista segue Porto Alegre – RS (88,8/100 mil hab.), Recife – PE (78,3/100 mil hab.) e Rio de Janeiro – RJ (66,8/100 mil hab.).

Mesmo com a introdução do teste rápido de detecção molecular (Gene Xpert®) nas principais cidades com alta taxa de incidência, as políticas de combate a TB ainda não atingem seus principais objetivos: maior taxa de cura, queda nas taxas de incidência e erradicação da TB.

O aparelho de detecção molecular rápida, Gene Xpert, surgiu como um aliado essencial para reduzir a taxa de mortalidade e interromper a transmissão através do rápido diagnóstico, usando uma reação de cadeia de polimerase do tipo heminested – PCR para

amplificar uma sequência específica do gene *rpoB* do Mtb; gene alvo de mutações que determinam a resistência à Rifampicina do bacilo (BOEHME, *et al.* 2010).

O teste para presença de Mtb e resistência à RFP ocorre em uma mesma plataforma que integra o processamento da amostra e todos os componentes necessários para a PCR, necessitando de uma única etapa manual, a junção do tampão bactericida ao escarro. Neste caso, o resultado é obtido em menos de 2 horas.

Apesar da melhoria das condições de vida, a instituição do tratamento farmacológico e uma relativa redução de mortalidade, a TB ainda constitui um agravo à saúde pública no âmbito global (ZUMLA *et al.*, 2014), por possuir raízes extremamente sociais ligadas à desigualdade social, à insuficiência de pesquisas visando o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas, aos fluxos migratórios nas suas infinitas razões, as deficiências do sistema de saúde e também a alta prevalência dos casos de tuberculose multidrogas resistentes associados à infecção pelo HIV (BRASIL, 2009). As altas taxas de novos casos estão associadas aos níveis de pobreza, desnutrição, uso de álcool e outras drogas, diabetes e altos níveis de infecção por HIV (WHO, 2014).

3.2. A etiopatogenia da tuberculose

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae* e possui um único gênero *Mycobacterium* (*fungus bacterium* – nome dado em referência à película formada na superfície de meios líquidos).

Em humanos e em alguns mamíferos, a TB é causada por um grupo de espécies de bactérias, o chamado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb), as quais são geneticamente semelhantes com aproximadamente 99% de semelhança do DNA. Esse

complexo inclui *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. canettii* além do organismo homônimo *Mycobacterium tuberculosis* (FORRELLAD et al., 2013).

O *M. tuberculosis* é uma bactéria patogênica aeróbia obrigatória, de crescimento lento, imóvel, de aproximadamente 0,4 µm de largura e 3-4 µm de comprimento. Denominados bacilos álcool-ácido resistentes devido à complexidade da parede celular e de crescimento fastidioso, por a cada 12-24 horas ocorrer divisão, o que requer um período de 8 semanas crescimento de culturas em laboratório (MURRAY et al., 2004).

A doença TB é infecciosa e transmissível, causada pelo *M. tuberculosis*, e afeta prioritariamente os pulmões, embora possa acometer outros órgãos e sistemas. Com muito mais frequência a TB pulmonar se apresenta sendo a forma mais relevante de apresentação para a saúde pública, pois é a principal responsável pela transmissão da doença (BRASIL, 2010).

A transmissão da doença é por via respiratória, “pela inalação de aerossóis produzidos pela tosse, fala ou espirro de um doente portador de lesão pulmonar” (BRASIL, 2011). Se não tratada, cada pessoa infectada com TB ativa, ou seja, bacilífera, pode infectar 10 – 15 pessoas por ano, de acordo com Ramachandran & Swaminathan (2012). Além disso, o risco é bem maior no caso de pessoas infectadas com HIV.

Os pacientes com a baciloscopia de escarro positiva (bacilíferos) são a principal fonte de infecção, sendo que cerca de 90% dos casos de TB são da forma pulmonar e, destes, 60% são bacilíferos. Somente 5% a 10% das pessoas infectadas pelo Bacilo de Koch (*Mtb*) adoecem (BRASIL, 2011). A predisposição do indivíduo a desenvolver a doença deve-se à interação entre fatores ambientais e genéticos (FERREIRA et al, 2005).

A doença apresenta uma patogenia complexa, dependente da virulência da cepa responsável pela infecção e das respostas defensivas estabelecidas contra essa infecção, de

acordo com a revisão de Kritski et al. (2007). Mecanismos complexos, envolvendo a integridade do sistema imune, a cooperação entre macrófagos e linfócitos T na contenção da infecção pelo Mtb, a virulência da cepa infectante e a carga bacilar tem papel importante na patogenia (FIOCRUZ, 2008).

A TB pulmonar apresenta-se sob a forma primária e pós-primária (ou secundária). Os sintomas clássicos da TB pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento. A TB pulmonar primária é mais comum em crianças. Por outro lado, a TB pulmonar pós-primária (ou secundária) pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais comum no adolescente e no adulto jovem (BRASIL, 2011).

3.3. Tratamento farmacológico

Os esquemas farmacoterapêuticos de tratamento da TB são padronizados no Brasil desde 1979 (2010). Segundo o MS (2011), tem-se como princípios que norteiam o tratamento da tuberculose: a associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente; deste modo, garantir a proteção cruzada tendo como objetivos, evitar a persistência bacteriana, a resistência aos fármacos e garantir a cura da doença.

Um aumento considerável da resistência primária à Isoniazida (4,4% para 6,0%), observada no II Inquérito Nacional de Resistência aos medicamentos antiTB, fez com que o MS realizasse uma revisão no tratamento, introduzindo o Etambutol na fase intensiva da doença (BRASIL, 2010; LOPES, 2010).

O tratamento da tuberculose é uma combinação terapêutica de três ou quatro fármacos para a prevenção de resistência. O quarteto INH, RFP, PZN e EB são os mais

utilizados como tratamento de primeira linha em muitos países. No Brasil, o esquema básico de tratamento da forma pulmonar e extrapulmonar tem duração de 06 meses, dividido em duas fases: fase intensiva e fase de manutenção. Nos dois primeiros meses de tratamento, administra-se uma combinação de medicamentos em dose fixa (DFC), comprimido contendo RFP, INH, PZN e EB, nas respectivas dosagens: 150mg, 75mg, 400mg e 275mg. Ao passo que nos últimos quatro meses se faz o uso somente da RFP e INH, como conforme Quadro 1.

Em todos os esquemas terapêuticos, a medicação deve ser administrada em uma única ingesta e de uso diário, ou em jejum (1 hora ou duas horas após o café da manhã), ou, em caso de intolerância digestiva, junto com uma refeição (BRASIL, 2010).

REGIME	FÁRMACOS	PESO DO PACIENTE	DOSE
Fase Intensiva (2 meses)	Esquema RHZE 150/75/400/275mg (DFC)	20Kg a 35Kg	2 comprimidos
		36Kg a 50Kg	3 comprimidos
		>50Kg	4 comprimidos
Fase de manutenção (4 meses)	Esquema RH Comprimidos de 150/75mg	20 a 35Kg	2 cp 150/75mg
		36Kg a 50Kg	3 cp 150/75mg
		50Kg	4 cp 150/75mg

Quadro 1 - Esquema básico de tratamento da tuberculose

Fonte: Modificado do Manual de Recomendações para o Controle da tuberculose no Brasil (BRASIL, 2009).

RHZE – esquema terapêutico rifampicina/isoniazida/pirazinamida/etambutol

DFC – dose fixa combinada

RH – esquema rifampicina/isoniazida

3.4. Fármacos empregados no tratamento padrão da tuberculose

3.4.1. Isoniazida

Desde 1952, a INH tem sido de extrema importância no tratamento da TB. O fármaco possui propriedades essenciais para uma terapia ideal, por ser eficaz, específica na ação contra o bacilo, com mínimo de toxicidade e de baixo custo (RAMACHANDRAN & SWAMINATHAN, 2012). Após três horas da administração, a concentração inibitória mínima chega a ser 90 vezes maior que a necessária contra os bacilos da TB. A INH tem forte poder bactericida associada à ação esterilizante (BRASIL, 2009).

A INH possui uma estrutura simples (Figura 1), constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida, e sua concentração inibitória mínima (CIM) para *Mycobacterium tuberculosis* varia entre 0,02-0,20 µg/mL. Tem função bactericida somente sobre bacilos de multiplicação rápida; sobre bacilos de crescimento lento e sobre aqueles de multiplicação intermitente, sua ação é restrita (ARBEX, 2010A).

A INH é um pró fármaco a qual é ativada pela enzima peroxidase KatG da própria micobactéria, ocasionando a produção de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato, além de radicais de origem orgânica, os quais inibem a formação de ácido micólico da parede celular, o que causa dano ao DNA e morte bacilar (CADE et al., 2010). Possui ação bacteriostática para o bacilo em repouso e ação bactericida para o bacilo em multiplicação. A INH penetra com facilidade nas células e é eficaz contra bacilos tanto no interior de macrófagos, ou em meio de cultura (HARDMANN et al., 2006).

A INH é metabolizada por acetilação, que pode ocorrer no fígado e na mucosa intestinal. Essa reação é catabolizada pela N-acetil transferase (NAT2) a qual realiza a transferência de um grupo acetila de uma coenzima acetil-A a um receptor amina, formando, então, uma amida. Essa reação de acetilação dá origem a acetilisoniazida, que ao ser

conjugada com ácido pirúvico e ácido α -cetoglutarico forma hidrazonas. A acetilisoniazida hidrolisa-se em monoacetil hidrazina e ácido isonicotínico. A monoacetil hidrazina por acetilação se torna diacetil hidrazina e o ácido isonicotínico ao ser conjugado com glicina forma a isonicotinil glicina. Todos os metabólitos citados não possuem atividade antituberculose (RAMACHANDRAN & SWAMINATHAN, 2012).

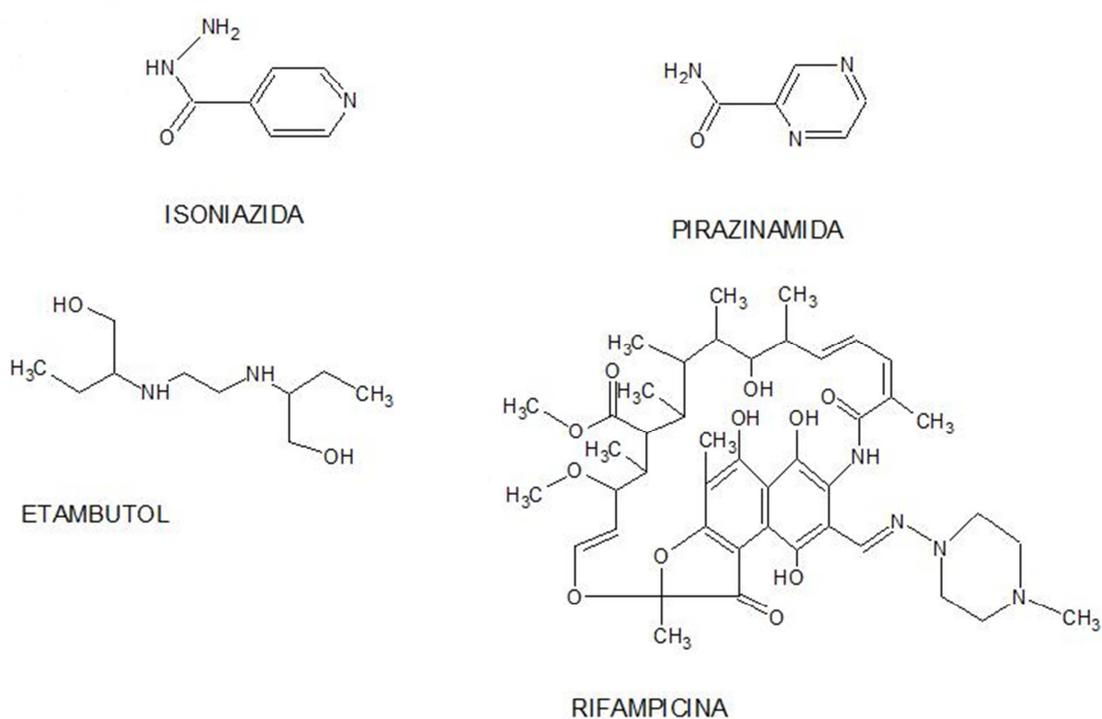


Figura 1: Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. Elaborado no ACD/ChemSketch®

Fonte: O autor

A excreção dos metabólitos de INH é por via renal (de 70-96%), uma pequena parte é excretada nas fezes e seu pico plasmático fica em torno de 1 a 5 horas dependendo da velocidade de acetilação de cada indivíduo (ver item “Os desafios da terapêutica da tuberculose”) (HARDMANN, et al. 2006).

3.4.2. Rifampicina

A RFP é um dos fármacos de primeira linha mais importantes do tratamento da tuberculose. É utilizada desde 1966 e sua CIM é de 0,05-0,50 µg/mL. A RFP é um derivado semi-sintético da Rifamicina B, a qual é produzida com resultado de processo de fermentação do *Streptomyces mediterranei* com ação em diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ARBEX, 2010A).

É um fármaco com característica bactericida, atua no bacilo em crescimento e em atividade metabólica, bem como, na fase estacionária, com metabolismo reduzido. Essa característica e sua associação com a PZN permitem a redução para 06 meses o tratamento da TB (ARBEX, 2010A).

O principal mecanismo de ação é a inibição da atividade RNA-polimerase DNA-dependente, por inibir a transcrição gênica da micobactéria por bloqueio da RNA polimerase DNA dependente, o que impede a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e de proteína pelo bacilo, ocasionando morte celular (Figura 2).

Tem boa absorção no trato gastrointestinal, ocorrendo redução, no entanto, na presença de alimentos. Apresenta boa distribuição, atingindo inclusive o sistema nervoso. Atravessa a barreira placentária e é encontrada no leite materno. Após uma dose oral de 600mg, o pico sérico é de 5-10 µg/mL ocorre entre 2h e 4h, diminuindo um pouco com doses repetidas o que é recompensado porque apresenta ação antibacteriana com níveis mínimos de concentração sanguínea (HARDMANN et al., 2006).

Cerca de 85% do fármaco é metabolizado pelas enzimas do sistema CYP450. De 60-65% de sua excreção ocorre por via biliar. Uma parte da RFP, cerca de 6-15%, é excretada, não metabolizada e reabsorvida no intestino, aumentando progressivamente o nível sérico do

fármaco. Após o período de 14 dias, ocorre uma autoindução metabólica, com redução da meia-vida de 3-5 h para 2-3 h.

O fármaco sofre desacetilação originando o metabólito desacetilrifampicina, o qual detém a atividade antibacilar. Ocorre a formação de formilrifampicina que é resultante da hidrólise da RFP (GOODMAN & GILMAN, 2004). Este fármaco é indutor das isoformas do CYP450 e de uma série de enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos (DOUGLAS & MCLEOD, 1999).

3.4.3. Pirazinamida

Sintetizada em 1936, com estrutura similar a INH, a PZA é um derivado do ácido nicotínico e é utilizada como bacteriostático desde 1952. A CIM é de 6,25-50,0 µg/mL em pH 5,5 para o Mtb. Muito bem absorvida via oral, distribui-se por todo o organismo, atingindo a concentração máxima plasmática em 2 horas. É bactericida e tem uma potente ação esterilizante (ARBEX, 2010A). A principal ação desse fármaco é a eliminação de bacilos persistentes, que são responsáveis pelo surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados no tratamento, a chamada recaída bacteriológica da tuberculose (LIMA et al., 2011). Devido a essa ação esterilizante, a redução do tratamento da TB de 12 meses para seis meses foi possível.

Também é um pró fármaco que necessita conversão pelas enzimas bacterianas nicotinamidase/pirazinamidase. Como mecanismo de ação, supõe-se o acúmulo de ácido pirazinoico (produto da conversão pelas enzimas após entrada passiva), o qual proporciona inativação de enzimas essenciais para a síntese de ácido micólico (como a ácido graxo sintase 1) por diminuição do pH intracelular. O metabolismo da PZA é hepático, há excreção de 70% na urina por filtração glomerular e a meia vida de eliminação é de nove a dez horas (HARDMANN et al., 2006).

3.4.4. Etambutol

O EB foi sintetizado em 1961 e é utilizado no tratamento desde 1966. Atua sobre os bacilos intra e extracelulares. Possui ação bacteriostática e sua concentração inibitória mínima é de 1-5 $\mu\text{g/mL}$ para o *M. tuberculosis*. Devido a interferência na síntese de arabinogalactano, principal componente da parede micobacteriana, o principal mecanismo do fármaco é inibir a enzima arabinosil transferase (codificada pelo gene *embB*), a qual media a polimerização da arabinose em arabinogalactano (Figura 2).

A administração é por via oral, em que é absorvido cerca de 80% da dose, atingindo o pico sérico em 2 a 4 horas. Uma parte do fármaco (de 20 a 30%) se liga às proteínas plasmáticas, contribuindo para ampla distribuição do fármaco. O metabolismo também é hepático e seu mecanismo principal é a oxidação a um aldeído intermediário, seguido de conversão a ácido dicarboxílico. É excretado cerca de 50 a 80% do fármaco pela urina, grande parte de forma inalterada e 8 a 15% como metabólitos; e nas fezes, a eliminação chega a 20% (HARDMANN et al., 2006).

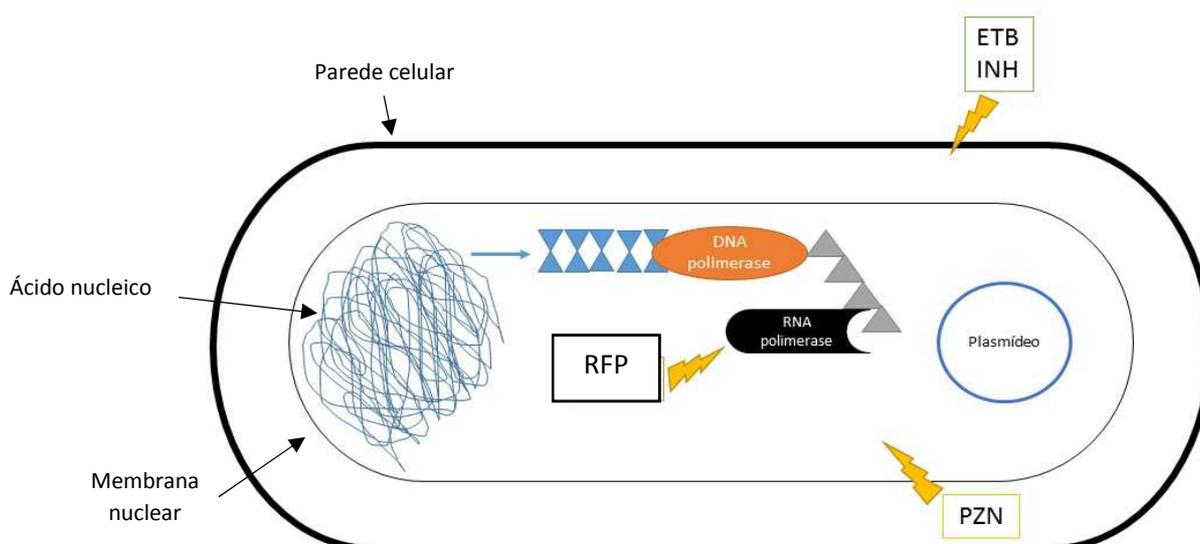


Figura 2: Esquema demonstrando os mecanismos de ação dos fármacos do esquema básico de tratamento da Tuberculose

Fonte: Modificado de ZUMLA, et al. 2014.

3.5. Os desafios da terapêutica da tuberculose

No tratamento medicamentoso preconizado pelo esquema básico de tratamento da TB, três dos quatro fármacos são potencialmente hepatotóxicos, que apresentam potenciais interações entre si; podendo apresentar um aumento da toxicidade quando utilizados com outros medicamentos, segundo Arbex et al. (2010A).

A elevação sérica das enzimas hepáticas após o início do tratamento frequentemente ocorre, porém, sem manifestações clínicas e sem necessidade de interrupção. A alteração ou interrupção deve ser realizada caso os valores das enzimas hepáticas forem três vezes o valor normal e com manifestação de sintomas clínicos, como a icterícia (BRASIL, 2011), por caracterizar lesão hepática induzida por fármacos antituberculose - LHIF – antiTB (aumento superior a duas vezes o valor normal das transaminases e níveis de bilirrubina), de acordo com Chen et al. (2015).

Há uma associação entre a elevação dos níveis séricos das enzimas hepáticas e a LHIF – antiTB; situação a qual tem sido uma preocupação crescente associada a infecção de TB latente, onde há a utilização da INH, EB e RFP por mais de 4 meses (SAUKKONEN et al., 2006). Sabe-se que os medicamentos tuberculostáticos sofrem o efeito de primeira passagem no fígado, onde as enzimas hepáticas convertem os fármacos através de diversas reações como oxidação, glucuronidação, desaminação, dentre outros.

A PZA é considerada o medicamento mais hepatotóxico do esquema básico sendo esse efeito adverso dose dependente. A INH de forma isolada, em doses adequadas ao peso, raramente produz hepatite medicamentosa, sendo mais comum em etilistas e idosos. A INH associada a RFP, pode levar a uma hepatite medicamentosa aguda e fulminante, felizmente rara, além de reativar infecções virais inaparentes em portadores assintomáticos, com consequente instalação de hepatite viral, especialmente a do tipo B (ARBEX et al., 2010A).

A RFP, de forma isolada, dificilmente provoca alterações hepáticas, podendo, entretanto, potencializar o efeito hepatotóxico da INH, pois induzem enzimas microssomais hepáticas integrantes do citocromo P450 que, por sua vez, facilitam a conversão da INH em monoacetil-hidrazina e hidrazina (metabólitos tóxicos da INH), agentes esses implicados na gênese da necrose hepática (ARBEX et al., 2010A).

Segundo Hardman et al. (1996), pacientes que utilizam INH devem ser acompanhados mensalmente para verificar sinais e sintomas de hepatite, como náuseas, anorexia, cansaço, icterícia e mal-estar. Além disso, devem ser alertados sobre a possibilidade de interrupção do tratamento, caso esses sintomas estejam presentes. A ocorrência de efeitos adversos constitui um desafio para a equipe de saúde que acompanha esses pacientes, porque são causas de hospitalização, comprometimento na confiança da relação médico-paciente e consequentemente, aumento de tempo de tratamento (OBERG, 1999).

A hepatotoxicidade, intrínseca ao tratamento da TB, pode gerar uma hepatite medicamentosa e o risco médio de ocorrência, segundo a literatura internacional (BLUMBERG et al., 2003; YEE et al., 2003; JAVADI et al., 2007; CHO et al. 2007), é de 1 a 36%, dependendo de fatores como raça, condições socioeconômicas e localização geográfica, sendo que o fator mortalidade não é descartado.

Além da questão da hepatotoxicidade intrínseca ao tratamento, outros problemas norteiam a farmacoterapia utilizada na TB, como as questões da resistência aos fármacos, o abandono do tratamento devido a efeitos adversos e as diferenças interindividuais no que diz respeito as etapas farmacocinéticas (metabolismo, distribuição etc.), as quais comprometem a eficácia do tratamento.

Entre os principais aspectos relacionados à dificuldade de adesão do paciente ao tratamento medicamentoso da tuberculose estão o tratamento prolongado e o surgimento de

efeitos adversos, como a intolerância gastrointestinal que pode advir de qualquer fármaco anti-TB e que pode vir acompanhada de náuseas, vômitos, dor epigástrica e abdominal (TANEJA & KAUR, 1990).

Em relação a resistência, há vários mecanismos, descritos na literatura, pelos quais as micobactérias impedem a atividade dos fármacos, dentre os mais conhecidos se pode destacar: mutações no gene *KatG* (que impedem a transformação da pró fármaco INH em metabólito ativo), mutação do gene *rpoB* (que codifica a cadeia beta da RNA polimerase tornando insensível ao fármaco RFP), mutações no gene *pncA* (que codifica a enzima pirazinamidase e impede a conversão da PZA para a forma ativa) e mutações no gene *embB* que, apesar do desenvolvimento lento, compromete a terapia com EB. Um dos mecanismos de resistência ao EB é a indução da bomba de efluxo a qual reduz o efeito das múltiplas drogas de tratamento, providenciando uma via alternativa para a ocorrência de mutações (SRIVASTAVA et al. 2010).

Muitos são os efeitos adversos associados ao uso do esquema terapêutico de TB e a partir do surgimento deles, a avaliação da permanência ou suspensão do tratamento é realizada. Segundo Arbex et al. (2010b), os fatores relacionados às reações adversas aos tuberculostáticos são variados, sendo relacionados à dose, horários de administração dos medicamentos, idade do paciente e seu estado nutricional, bem como à presença de doenças ou disfunções pré-existentes, tais como etilismo, comprometimento da função hepática ou renal e coinfeção pelo HIV. Segundo Singla et al. (2014), os efeitos adversos diminuem a eficácia do tratamento, devido ao fato de contribuírem para a falha terapêutica, a não aderência, a resistência às drogas utilizadas e a recaída.

Um grande contingente de pacientes possui uma variabilidade na resposta as drogas anti-TB e a isso geralmente se afirma ser devido aos processos farmacocinéticos, já que

grande parte dessa população apresenta concentrações plasmáticas dos tuberculostáticos abaixo dos valores de referência (TOSTMANN, et al. 2013).

Há variabilidade farmacocinética dos agentes usados contra a TB, descrita nas mais diversas etnias e populações (WILKINS et al. 2006; MCILLERON et al. 2011; MAGDORF et al, 2011; REQUENA-MÉNDEZ et al. 2012; SEGOVIA et al. 2013; TOSTMANN et al. 2013; ZVADA et al. 2014). A simples variabilidade farmacocinética de um único fármaco durante a administração do regime multidroga contra TB está associada a resistência e a falha terapêutica, segundo estudo de Egeland & Peloquin (2012).

A RFP sendo um potente indutor enzimático, Chen e Raymond (2006) observaram o aumento da toxicidade causada pela INH ao administrar em conjunto a RFP, devido a indução das isoformas do sistema enzimático CYP450, as quais estão relacionadas a conversão da acetilhidrazina em compostos reativos e, conseqüentemente, hepatotóxicos.

Algumas variações e polimorfismos em enzimas participantes do metabolismo de drogas tem sido observadas e demonstram influenciar a concentração sistêmica dos fármacos antituberculose (SINGH et al., 2009). Diferenças nas concentrações de INH interindivíduos tem sido associadas aos polimorfismos da enzima NAT 2 (SINGH et al., 2009), a qual é uma importante enzima metabolizadora envolvida na Fase II do metabolismo (Figura 3).

No estudo de Roy et al. (2008), os autores relatam que a hepatotoxicidade induzida pelo uso de INH sofre influência da acetilação pela NAT2, da oxidação pelo citocromo P450 oxidase 2E1 e detoxificação pela glutaciona-S-transferase (GST); já que todas essas enzimas pertencem a via metabólica do fármaco (Figura 3).

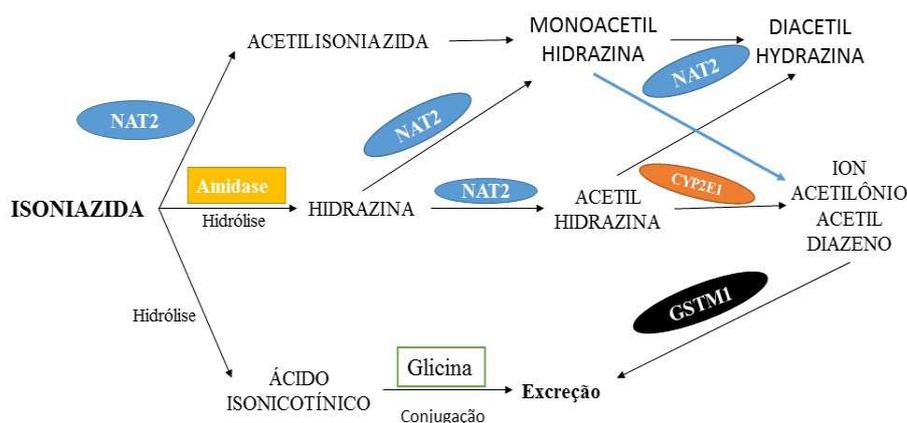


Figura 3: Metabolismo da isoniazida.

Fonte: Modificado de SOTSUKA *et al.* 2011 e RAMACHANDRAN & SWAMINATHAN *et al.* 2012.

3.5.1. A enzima Arilamina N-acetiltransferase 2 (NAT 2)

A enzima arilamina N-acetiltransferase 2 (NAT2) é a principal enzima responsável pela metabolização da INH em substratos hepatotóxicos, ocasionando casos graves de hepatotoxicidade. A NAT2 metaboliza também produtos químicos e substâncias cancerígenas. Essa enzima varia geneticamente nas populações humanas e a presença de polimorfismos tem sido associada a toxicidade medicamentosa, bem como a eficácia de alguns medicamentos e susceptibilidade cancerígena (TEIXEIRA, *et al.* 2010).

Essa enzima é a principal responsável pela inativação e metabolização da INH, codificada pelo gene NAT2. É uma enzima da Fase II de conjugação que catalisa a transferência do grupo acetil, a partir do cofator Acetil-coenzima A (Acetil-CoA), ao terminal nitrogenado do fármaco. Após acetilação, a acetilisoniazida é hidrolizada por uma amidase à acetil-hidrazina, a qual é oxidada em intermediários hepatotóxicos pela mono-oxigenase CYP2E1. Uma pequena parcela de acetilhidrazina, concomitantemente, é novamente acetilada pela NAT2 formando diacetil-hidrazina, um composto não tóxico em comparação aos outros intermediários. A acetil-hidrazina é considerada uma hepatotoxina, porque sua ativação

metabólica pela enzima CYP2E1 gera metabólitos acilantes e alquilantes altamente reativos. Quando ocorre a ligação covalente desses agentes alquilantes a macromoléculas no fígado, ocorre então a lesão hepática (KITA et al., 2001; HUANG et al., 2002; HUANG et al., 2003; HUANG, 2007).

O controle genético da atividade da enzima NAT2 é realizada pelos alelos NAT2*4 e *12 e os polimorfismos genéticos estão associados as diferenças interindividuais (AZUMA et al. 2013, BRITO et al. 2005). O gene NAT2 é bastante polimórfico e está localizado no cromossomo 8p22 e tem 870 pares de base no éxon codificante. A presença ou ausência de polimorfismos de nucleotídeo único resultam em variações na capacidade de acetilação da enzima (SINGH et al., 2009).

Segundo Ramachandran & Swaminathan (2012), os chamados acetiladores rápidos possuem o alelo NAT2*4 que codifica a ação completa da enzima e, portanto, para esses tipos de pacientes a administração de INH deve ser redefinida, ou seja, diferente das doses convencionais. Os indivíduos acetiladores intermediários são os que possuem um alelo NAT2 ativo e um inativo, no caso, mutação em heterozigose. Pela técnica molecular, os acetiladores lentos na população humana são os que possuem os genótipos NAT2*5A, NAT2*5B e NAT2*6A e a esses indivíduos tem se descrito variações plasmáticas e um significativo fator de risco de susceptibilidade à hepatotoxicidade induzida por fármacos antituberculose - HIF – antiTB (CHO et al. 2007; DU et al. 2013; SHENG et al. 2014; SOTSUKA et al. 2011).

Segundo Possuelo (2008), uma combinação de SNPs constitui um distinto haplótipo que é tratado como alelo do sistema e cada alelo é associado com um fenótipo de acetilação dependendo de quais mutações contêm. Nessa classificação, três fenótipos são descritos: a combinação da presença de dois alelos mutantes define o fenótipo de acetilação lenta; um alelo selvagem e um alelo mutante, acetilador intermediário e dois alelos selvagens, os acetiladores rápidos.

Através de clonagem e expressão gênica, Zang et al. (2007) caracterizaram as funções dos SNPs e seus haplótipos, sugerindo sete SNPs como redutores da atividade de acetilação (G191A, T341C, G364A, A411T, G499A, G590A E G857A); alguns compartilham de mecanismos comuns para o fenótipo (alteração em sítio catalítico, mudança de atividade substrato-dependente etc).

Tabela 1 – Alelos humanos mais frequentes de NAT2 e seus respectivos fenótipos

Alelo	SNP*				Fenótipo
	T341C	G590A	G857A	A803C	
NAT2*5	X				LENTO
NAT2*6		X			LENTO
NAT2*7			X		LENTO
NAT2*12				X	RÁPIDO

Modificado de Possuelo (2008). *SNP – polimorfismo de único nucleotídeo.

Na pesquisa de Sabbagh et al. (2011), sobre a relação entre a diversidade genética e os métodos de subsistência em 128 populações do mundo, os autores encontraram uma prevalência do fenótipo de acetiladores lentos (variante 590A) em populações praticantes da agricultura e pastoreio de 45,4% e 48,2%, respectivamente. Acredita-se que a mudança na economia de subsistência na transição do período neolítico modificou seletivamente a via de acetilação da enzima NAT2.

Em um estudo de reconstrução dos haplótipos de NAT2 foram encontrados 33 haplótipos distintos sendo que oito ocorrem no mundo em uma frequência maior que 1%; os acetiladores rápidos com três haplótipos (NAT 2*4: 32,4%; NAT 2*12A: 2,1%, NAT 2*13A: 1,5%) e para acetiladores lentos com cinco haplótipos (NAT 2*5B: 26,9%, NAT 2*6A: 24%,

NAT 2*7B: 6,1%, NAT 2*5C: 2%, NAT 2*5A: 1,7%). A porcentagem de acetiladores nos três fenótipos conhecidos é dependente da origem étnica (THIER, et al. 2003).

Nos relatos de Ben Mahmoud et al. (2012), os diplótipos relacionados a acetiladores lentos e fator de risco para a hepatotoxicidade induzida pela INH foram NAT2*5B/5B, NAT2*6A/6A, 481T/T e 590A/A. Supõe-se que os mesmos possam ser biomarcadores excepcionais para prever a hepatotoxicidade induzida por drogas utilizadas no tratamento da TB. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Ruiz et al. (2012), realizado nos Estados Unidos, onde também observou-se que o genótipo NAT2*6A/6A é o fenótipo de acetiladores muito lentos.

Em um estudo do perfil genético entre indivíduos de duas regiões diferentes do Brasil, foram detectados sete polimorfismos mais frequentes em brasileiros do que em outras populações: 191 G>A, 282 C>T, 341 T>C, 481 C>T, 590 G>A, 803 A>G E 857 G>A (TEIXEIRA et al., (2009). A frequência dos alelos de NAT2 foram 33% para NAT2*5B, 26% para NAT2*6^a e 20% NAT2*4, demonstrando que a população brasileira nos grupos estudados de alelos, predominantemente está associada aos genótipos de acetilação lenta do que aos genótipos de acetilação rápida e intermediária.

Já o estudo de Talbot et al (2010), o qual comparou três grandes grupos étnicos no Brasil (afro-brasileiros, ameríndios e brancos), constatou -se que para a mutação 481T (*rs1799929*), a frequência alélica foi de 38,79% nos três grupos de estudo.

As frequências encontradas para alguns alelos da NAT2 encontrados nos estudos brasileiros divergem com as encontradas em muitas populações de diversos países, como constatado na população marroquina (n=163), as seguintes frequências para os alelos NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 e NAT2*14 de 53%, 25%, 2% e 4%, respectivamente (GUAOUA et al. 2014).

No estudo de Jung et al. (2015), houve uma prevalência de 22,2% de baixas concentrações de INH na população asiática, sendo que dessas 64,7% foram em acetiladores rápidos. No entanto, também ocorreram altas concentrações em acetiladores lentos (cerca de 70%). Desta forma, verifica-se a influência da variabilidade genética nos níveis séricos de INH. Resultado semelhante foi descrito por Singh et al. (2009) em indianos, com distribuição entre os fenótipos lento (55%), intermediário (32%) e rápido (13%).

3.6. Farmacogenômica na tuberculose

O papel da farmacogenômica é identificar os polimorfismos que influenciam na cinética e conseqüentemente na eficácia ou toxicidade de agentes terapêuticos e através dessa informação, aplicar na prática clínica para obtenção de melhoras no tratamento dos pacientes (PANG, 2003; TOMALIK-SCHARTE et al., 2008).

Sabe-se que as diferenças individuais existem e são, em sua maioria, responsáveis pela resposta de cada indivíduo ao uso de medicamentos. Cerca de 20 – 95% das variações na farmacocinética de fármacos, conforme Ramachandran e Swaminathan (2012), são devido a fatores genéticos, caso seja uma modificação (mutação ou polimorfismos) nos seus respectivos genes codificantes. “Polimorfismos em enzimas metabolizadoras podem afetar a atividade enzimática e influenciar na conformação química das drogas e seus metabólitos” (SHENG et al. 2014), o que pode gerar uma predisposição a reações adversas hepáticas.

Há mais de dez anos tratada como assunto principal nas mesas de debate dos farmacologistas, a farmacogenômica tem mostrado sua importância na terapêutica de muitas doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares, desordem bipolar, depressão, HIV, asma, diabetes (KERB, 2006; RAMACHANDRAN & SWAMINATHAN, 2012; BABALIK et al., 2013; HUANG, 2014), inclusive a tuberculose.

McIlleron et al. (2015) afirmam que em qualquer dose padrão de medicamentos, a variação individual e efeitos tóxicos podem ser observados, tendo como fatores contribuintes: idade, sexo, etnia, índice de massa corporal, estado fisiológico, co-morbidades, dieta e medicações co-prescritas.

O uso mais comum da farmacogenômica é na predição de efeitos adversos, exposição ao fármaco abaixo do ideal e/ou perda da eficácia; podendo assim, seu uso impactar a escolha de drogas, de regimes terapêuticos ou duração da terapia individual ou em uma população (MCILLERON et al. 2015)

No estudo de Matsumoto et al. (2014), os autores demonstraram que para a infecção latente da TB, a terapia baseada na farmacogenômica (genotipagem para NAT2) é mais eficaz e segura do que a terapia padrão.

No estudo randomizado realizado por Azuma et al. (2013), os resultados relatam a eficácia do regime terapêutico baseado no genótipo de NAT2 testado por eles. O perfil de acetilação da isoniazida tem importante implicação terapêutica nos indivíduos com comorbidades, infectados com HIV e pacientes com falência renal crônica, segundo Ramachandran e Swaminathan (2012). Cerca de 78% dos acetiladores lentos em regime padrão sofreram danos hepáticos, enquanto nenhum dos acetiladores lentos tratados com reajuste de dose, a partir da caracterização genética, sofreram lesão hepática. Em relação aos acetiladores rápidos, foi observada uma baixa incidência da falha terapêutica nos pacientes sob intervenção farmacogenômica (cerca de 20% a menos).

As drogas alternativas, por se tratarem de agentes mais agressores em termos de toxicidade e eficácia, não seriam uma boa opção de substituição para os pacientes que apresentam resposta ineficaz ao tratamento. A farmacogenômica implica na eficácia terapêutica e minimiza a ocorrência de efeitos adversos, por conseguinte, minimiza os riscos

de abandono do tratamento por se basear nas características genéticas (genótipo e fenótipo) do usuário/paciente. A inclusão do teste farmacogenômico na triagem clínica poderia ser uma saída para observar a heterogeneidade da população e assim indicar o melhor manejo terapêutico e obter o sucesso do tratamento.

3.7. Controle terapêutico

Existe um certo número de pacientes que falham na resposta ao tratamento convencional, segundo Magis-Escurra et al. (2012), essas falhas propiciam a recaída ou até mesmo o desenvolvimento de resistência. Muitos são os fatores de risco que resultam na resposta inadequada ao tratamento da TB.

O controle terapêutico trata do monitoramento das concentrações plasmáticas de fármacos com a “finalidade de ajuste de dose e individualização da terapia farmacológica para determinado paciente” (SANTOS, 2012). Essa individualização terapêutica de doses é guiada pelas concentrações plasmáticas e pode auxiliar o aperfeiçoamento da resposta ao tratamento, de acordo com Magis-Escurra et al. (2012).

A utilização dos dados resultantes das concentrações plasmáticas se baseia no conceito da homogeneidade cinética, quando a resposta farmacológica está intimamente ligada à concentração do fármaco no sítio receptor. A variabilidade na resposta de pacientes deve-se a influência de fatores farmacocinéticos, farmacodinâmicos, interação de fármacos e genéticos também, como observou-se nos itens “Os desafios da terapêutica da Tuberculose” e “Farmacogenômica na Tuberculose”.

A concentração dos fármacos pode variar também devido a fatores sócio demográficos, como constatados pelos estudos de Um et al., (2007), Barroso et al., (2009) e Requena-Méndez et al., (2012). O estudo de Um et al. (2007) encontrou associação entre a

concentração da INH com o sexo masculino ($P=0,026$), a concentração sérica de albumina ($P=0,006$) e a dose ajudada pelo peso ($P=0,005$); sendo as concentrações da PZA associaram-se ao sexo e a dose por peso, as concentrações do EB tiveram associação significativa com a idade, dose por peso e o clearance da creatinina. Já as concentrações da RFP não tiveram associação significativa com nenhum dos fatores sócio demográficos supracitados.

No estudo de Requena-Méndez (2012), a concentração máxima sérica de RFP em 2 horas teve associação com o sexo feminino ($P<0,001$) na população peruana. Já no artigo de Barroso et al. (2009), em indivíduos com tuberculose droga suscetível houve associação entre a concentração de INH com o IMC, tabagismo, etilismo e concentração sérica de albumina.

A cinética dos fármacos determina a concentração plasmática destes alcançada para um período de tempo e após a administração de várias doses, as concentrações destes fármacos entrarão em equilíbrio estacionário e corresponderão a concentração do fármaco no receptor (OGA et al. 2014).

O status de equilíbrio estacionário compreende o intervalo de 5-6 meias-vidas para a coleta de sangue dos pacientes que serão submetidos a monitorização terapêutica. Na prática, de acordo com Magis-Escurra et al. (2012), as amostras para a realização de análises farmacocinéticas são coletadas com no mínimo 2 semanas de tratamento, quando as concentrações plasmáticas das drogas antituberculose de primeira linha estão no estado de equilíbrio.

Segundo Alsuntan & Peloquin (2014), a monitorização terapêutica proporciona observar as concentrações plasmáticas, antes dos pacientes passarem por falha, abandono ou eventos de intoxicação, sendo uma excelente ferramenta para o manejo dos casos clínicos complexos.

No estudo de coorte de Heysell et al. (2010), dos 42 indivíduos que tiveram resposta lenta ao tratamento de duas semanas, 22 foram monitorados para rifampicina e após a realização do ajuste de dose em 18 deles, todos tiveram aumento da concentração de RFP em comparação à concentração anterior sem ajuste. No entanto, 89% destes realmente obtiveram concentrações plasmáticas dentro da faixa terapêutica.

Dos 39 indivíduos que foram monitorados para a INH, 59% tiveram baixas concentrações plasmáticas e após o ajuste de dose em catorze pacientes, doze deles aumentaram as concentrações plasmáticas, entretanto somente 29% destes tinham as concentrações dentro do intervalo terapêutico esperado.

Heysell et al. (2010) ainda afirmam que os níveis de RFP abaixo do intervalo esperado foram mais propensos a correção através do ajuste de dose do que os níveis de INH diariamente doseados abaixo da faixa terapêutica. Nesse estudo não foram constatados baixos níveis séricos de EB e PZN.

O estabelecimento da monitorização regular dos pacientes com genótipos, haplótipos e características fenotípicas que possam influenciar na variância das concentrações dos fármacos, bem como, na eficácia do tratamento e evolução para cura, ajudará na prevenção da morbidade e mortalidade causada pelos efeitos adversos das drogas utilizadas na terapia contra a TB, segundo Singla et al. (2014).

4. MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo

Estudo descritivo – analítico observacional de corte transversal.

4.2. Local de estudo

O estudo foi realizado na Policlínica Cardoso Fontes, centro de referência estadual para o controle da doença, sendo uma das unidades de referência no diagnóstico de pacientes acometidos por TB na cidade de Manaus.

Dos pacientes que procuraram o centro ou foram encaminhados dos serviços de triagem e ao marcar a consulta para avaliação médica, foi solicitado o exame de pesquisa de BAAR por PCR em tempo real, além do exame de Raio X. Ao receberem o diagnóstico médico positivo para TB, os pacientes foram encaminhados para o acompanhamento da enfermagem (Aprazamento), o qual orientava em relação a doença e o tratamento a ser utilizado, bem como preenchia a guia de encaminhamento para a Unidade Básica de Saúde (UBS) mais próxima de cada paciente.

Desde 2003, as ações de controle da TB foram expandidas para a rede básica de saúde de Manaus e nelas são realizadas o acompanhamento mensal e retirada da medicação contra TB em uso. Os casos diagnosticados e notificados pelas unidades de referência (Policlínica Cardoso Fontes, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e Ambulatório Araújo Lima) passaram a ser encaminhados para continuidade do tratamento nas UBS e encerrados por transferência nas unidades de origem (MARREIRO et al., 2009).

4.3. População de estudo

Amostragem

A amostra foi composta pelos pacientes com TB pulmonar admitidos consecutivamente na Policlínica Cardoso Fontes, nos meses de fevereiro de 2015 a março de 2016.

De forma a representar a população estudada, o tamanho amostral foi calculado com o auxílio do programa Microsoft Excel, com base na variância populacional obtida em estudos anteriores. O número de pacientes diagnosticados com BAAR positivo na unidade de saúde durante o período de janeiro a dezembro de 2012 foi utilizado como referência para o cálculo do tamanho amostral ($n = 1088$). O erro estimado e o intervalo de confiança estabelecidos para os cálculos foram 5% e 95%, respectivamente.

Considerando a prevalência de pacientes com baixos níveis de fármacos empregados no tratamento padrão de 23,5% em um estudo semelhante (UM et al., 2007), a amostra calculada neste estudo foi de 221 pacientes.

4.4. Critérios de inclusão

Pacientes diagnosticados com TB pulmonar pela presença do DNA bacteriano detectada por PCR em tempo real, classificados como casos novos, maiores de 18 anos, que utilizaram corretamente os medicamentos antituberculosos do Esquema Básico de Tratamento por, pelo menos, duas semanas antes da coleta das amostras e que aceitaram participar do estudo de forma voluntária.

4.5. Critérios de exclusão

Pacientes diagnosticados com doenças gastrointestinais e com disfunção renal e/ou hepática, pacientes com doenças mentais ou disfunção cognitiva que não tenham possibilidade de responder o questionário e pacientes que não atenderam a tomada de dose por, pelo menos, duas semanas.

4.6. Coleta dos dados dos pacientes

As informações sociodemográficas dos pacientes foram obtidas por uma entrevista, bem como, dos prontuários disponíveis na unidade de saúde, e foram avaliadas por meio do CCEB, Critério de Classificação Econômica Brasil (ABEP, 2013). Neste sentido, foram avaliadas características domiciliares (presença e quantidade de alguns itens domiciliares de conforto e grau de escolaridade do chefe de família) para diferenciar a população, ou seja, realizar uma segmentação econômica.

O CCEB atribui pontos em função de cada característica domiciliar e realiza a soma destes pontos. É feita então uma correspondência entre faixas de pontuação do critério e extratos de classificação econômica definidos por A1, A2, B1, B2, C1, C2, D e E.

Na abordagem foram esclarecidos o motivo e as condições da pesquisa e além da obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente. Os dados foram dispostos em um formulário especialmente desenvolvido para esta coleta de informações. O instrumento de coleta de dados elaborado consistiu em um questionário estruturado que aborda os dados sócio demográficos e clínicos, o qual foi preenchido exclusivamente pelo pesquisador (APÊNDICE 1).

Posteriormente, as informações coletadas foram tabuladas em uma planilha do programa Microsoft Excel, após o processo de dupla checagem para a garantia da confiabilidade dos resultados.

Os pacientes foram abordados em dois momentos: no dia do resultado do diagnóstico (1º dia) e no retorno para coleta da amostra de sangue (15º dia - duas horas após a ingestão do medicamento), onde foram questionados quanto ao uso do DFC nas últimas semanas, sendo solicitada a entrega do cartão de acompanhamento farmacoterapêutico (APÊNDICE 3) e/ou da embalagem vazia do medicamento. O diagnóstico positivo para TB foi realizado na policlínica através da detecção molecular rápida (Gene Xpert), uma reação em cadeia de polimerase (PCR) tendo como amostra o escarro.

A coleta ocorreu de acordo com o Protocolo de Monitorização Terapêutica (APÊNDICE 1) formulado pela equipe e a amostra sanguínea foi encaminhada para o Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, onde as análises bioquímicas além de separação e congelamento para futura extração de DNA (de acordo com o protocolo do fabricante do kit (QIAGEN) e as análises moleculares foram realizadas (Figura 5).

Para obtenção dos resultados bioquímicos foi utilizado o analisador automático multiparamétrico de bioquímica (Cobas - Roche®), localizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas.

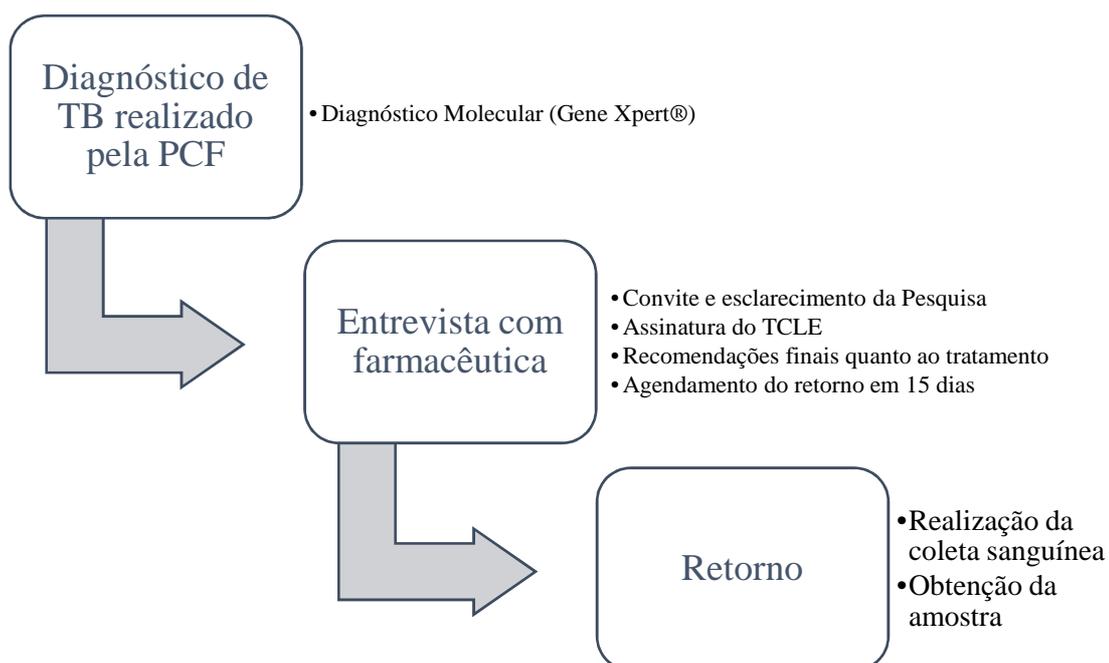


Figura 4: Fluxograma de coleta das amostras empregado no estudo.

Fonte: O Autor.

PCF – Policlínica Cardoso Fontes

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Os resultados das análises foram organizados em um formulário padronizado com dados clínico-laboratoriais, genéticos e sócio demográficos de preenchimento do pesquisador (APÊNDICE 2) e também sofreu o processo de dupla checagem para tabulação em planilha do programa Microsoft Excel.

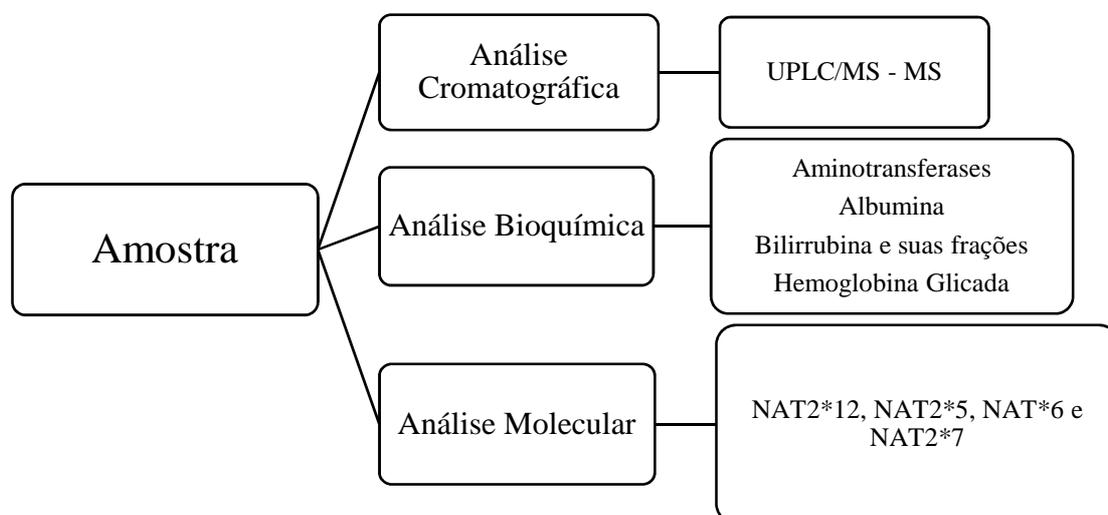


Figura 5: Fluxograma de análise das amostras empregado no estudo.

Fonte: O Autor.

UPLC – MS/MS – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em tandem.

4.7. Determinação das concentrações séricas dos fármacos nas amostras dos pacientes

A análise das amostras de soro dos pacientes foi efetuada através de um método previamente validado para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. E, neste caso, a cromatografia líquida de alta eficiência (a qual em estudos sobre TB nos mais diversos países, é amplamente utilizada) acoplada a espectrometria de massas foi empregada. A técnica requer menor processamento das amostras, possibilitando análise de diversas amostras clínicas (SONG et al., 2007; ZHOU et al., 2013), experimental extremamente eficiente em relação aos ensaios realizados em outras pesquisas (MCILLERON, et al. 2006, BURHAN et al., 2013; ZHOU et al., 2010). Os níveis terapêuticos considerados adequados para cada fármaco está descrito na tabela 2 a seguir, baseada em Peloquin (2002).

Tabela 2 – Faixa terapêutica dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose segundo Peloquin (2002)

Fármacos	Dose	C _{max} *
Rifampicina	600 mg/diária	8-24 µg/mL
Isoniazida	300 mg/diária	3-6 µg/mL
Pirazinamida	1600 mg/diária	20-65 µg/mL
Etambutol	1100 mg/diária	1-6 µg/mL

*C_{max} – Concentração máxima

O método é baseado em cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrofotômetro de massas (SONG et al., 2007), no entanto, com algumas alterações realizadas para a utilização da Cromatografia Líquida de Ultra eficiência (UPLC). Um método extremamente eficaz e preciso, que injeta mínimos volumes do analito sem comprometer nos resultados (BAIETTO et al., 2015) e foi realizado no LADETEC

(Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Soluções estoque foram preparadas contendo 10mg/mL de cada fármaco (INH, PZA, EB) contendo metanol/água 1:1, e a RFP foi preparada a 100% metanol, as quais foram armazenadas em -70°C. Soluções dos analitos INH, EB, PZA e RFP foram combinadas e diluídas em 50% de metanol para a produção dos padrões de trabalho, bem como, uma solução combinada dos dois padrões internos rifabutina e ácido 6-aminonicotínico foi diluída em 100% metanol na concentração de 1mg/mL.

As curvas de calibração foram construídas com seis concentrações diferentes de cada padrão para verificação da linearidade (INH e EB 0, 0,5, 1, 2, 4 e 8µg/mL; RFP e PZA 0, 5, 10, 20, 40 e 80µg/mL) e assim, garantir a eficiência e reprodutibilidade das análises. Amostras controle foram utilizadas nas concentrações baixas (INH e EB: 2µg/mL, RFP: 5µg/mL e PZA: 20µg/mL) e altas (INH e EB: 8µg/mL, RFP: 20µg/mL e PZA: 80µg/mL), preparadas por contaminação de soluções estoque de soro.

A preparação das amostras foi dada por 50µL de soro colocado num tubo contendo 50µL de 50% metanol e 50µL dos padrões internos. Para a calibração, 50µL aliqüotados de cada padrão foram colocados em tubos contendo 50µL de soro branco e 50µL de padrões internos, agitados em vórtex por 1 min e centrifugados por 2 minutos em uma rotação de 16100g. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 50µL de metanol a 100%, centrifugados por 7 minutos em 16100g e então 90µL do sobrenadante transferido para inserts e vials do sistema de CLAE – MS/MS.

As amostras foram analisadas utilizando uma coluna de hidrosfera C18, uma coluna octadecilssilano (C18), da marca Agilent Zorbax® HPLC Eclipse XDBC18 (2,1mm x 50mm x 3,5mm), onde um volume de 10µL, de cada amostra, foi injetado nessa coluna de fase

reversa e a separação cromatográfica aconteceu na temperatura controlada de 30°C em 6 minutos. As injeções somente ocorreram após o condicionamento da coluna com a fase móvel.

A fase móvel foi composta dos reagentes metanol e água com o aditivo ácido fórmico a 0,3%. A fase móvel teve um gradiente de 0,3 % de ácido fórmico e metanol e 0,33% de ácido fórmico e água. Gradiente este de 60:40 v/v na razão de fluxo de 300µL/min por 1,8 minutos, seguido de 80:20 v/v na razão de fluxo 300µL/min por 0,2 minutos, logo depois fluxo de 95:5 v/v na razão de fluxo 400µL/min por 1,3 minutos, retornando em seguida a primeira vazão e mesmo fluxo até completar 6 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado na voltagem capilar de 3,5 kV, voltagem cônica 15 – 28 V, energia de colisão 10 – 19 eV e dependendo do analito, a faixa de colisão do gás foi estabelecida, conforme Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Condições de espectrometria de massas em tandem e faixas de colisão do gás de cada analito empregadas nas análises

Analitos	Voltagem cônica (V)	Energia de colisão (eV)	Faixa de transição MRM (m/z)
Isoniazida	24	13	138 → 121
Rifampicina	28	18	823.1 → 791.2
Etambutol	23	14	205 → 116
Pirazinamida	28	15	124 → 81
Ácido 6-aminonicotínico	28	19	139 → 93
Rifabutina	28	18	847.7 → 815

Modificado de Song et al. (2007)
MRM – multiple reaction monitoring

Os equipamentos utilizados foram UHPLC focused+ Ultimate 3000 (Thermo Scientific®) e TSQ Quantiva massas (Thermo Scientific®) com o sistema de integração de dados Dionex Ultimate 3000, também da empresa Thermo Scientific®-Applied Biosystems®.

Os cálculos das concentrações plasmáticas foram realizados através das áreas dos cromatogramas obtidos de cada amostra e seus respectivos padrões internos, utilizando a curva analítica para cada fármaco (Figura 6).

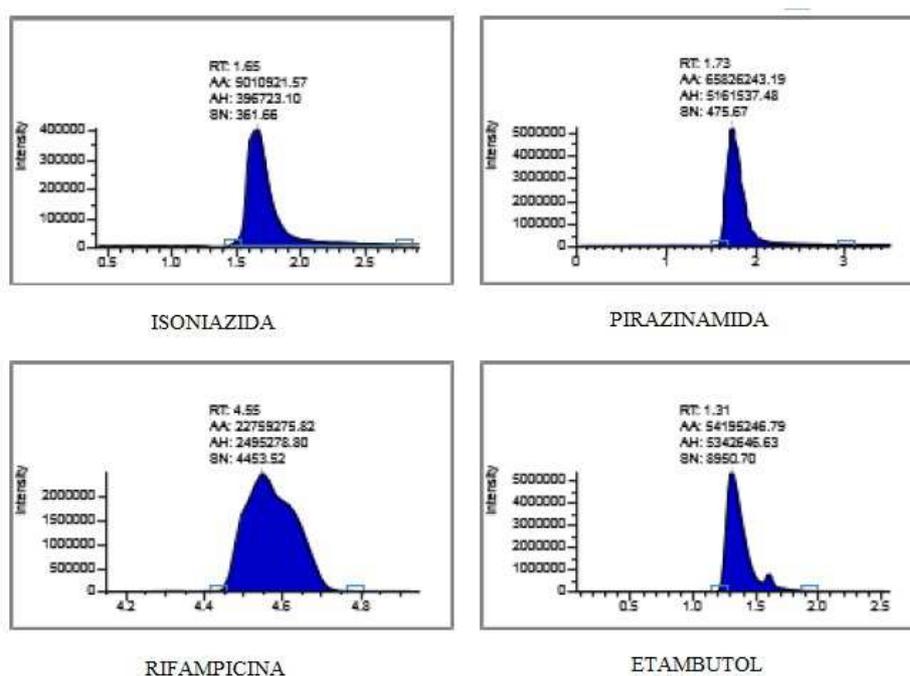


Figura 6: Cromatogramas representativos das análises realizadas.

4.8. Análises moleculares

O DNA genômico foi isolado de leucócitos a partir de 200 µL de sangue, utilizando-se o método direto QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®), conforme protocolo do fabricante. O DNA foi armazenado a -20 °C até o momento das análises.

Os polimorfismos para NAT2 (*5, *6, *7 e *12) foram analisados pela técnica de PCR em tempo Real com as sondas (rs1799929, rs1799930, rs1799930 e rs1041983) para cada polimorfismo customizado junto a empresa Applied Biosystems (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988; PAN et al., 2000; HIRATSUKA M, 2002; HAMDY et al., 2003).

O qPCR em Tempo Real foi realizado no Laboratório de Genômica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) utilizando o aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific®).

4.9. Análise estatística dos dados

Os resultados são apresentados de maneira descritiva através da utilização de tabelas e gráficos. Aplicou-se análise univariada para descrição da amostra, para variáveis contínuas foram avaliadas medidas de tendência central e as respectivas medidas de dispersão e para variáveis categóricas foram apresentadas porcentagens.

As variáveis foram comparadas entre os pacientes com níveis séricos baixos e normais usando o teste *t* de Student para variáveis contínuas, teste do qui-quadrado (χ^2) para variáveis categóricas, além da análise multivariada por regressão logística para avaliar os fatores de risco para os níveis terapêuticos dos fármacos anti-TB.

Os resultados foram testados quanto à normalidade e, dependendo do resultado, testes paramétricos ou não paramétricos foram aplicados para comparação. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas estatísticos STATA (StataCorp LP, TX, USA) adotando como nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.10. Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas (CEP – UFAM) por meio do Parecer n. 692.725 (ANEXO 1) e foi desenvolvida em conformidade com as determinações do Conselho Nacional de Saúde.

As coletas de dados e de amostras biológicas somente foram realizadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 4), através do qual se assegura o sigilo das informações, anonimato e direito a desistência da participação no estudo a qualquer momento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta de dados e amostras foram realizadas no período de fevereiro de 2015 a março de 2016, na Policlínica Cardoso Fontes. Duzentos e oitenta entrevistas foram realizadas acerca dos dados sócio demográficos e laboratoriais dos pacientes. Desse total, 226 pessoas retornaram à Policlínica para coleta de amostra de sangue, gerando uma taxa de 80,7% de adesão dos pacientes à pesquisa. Diversos fatores como abandono do tratamento, óbito, agravamento do estado de saúde, transferência para outra cidade, desinteresse pelo estudo, entre outros, podem ter contribuído para o não retorno destes pacientes. E nesse cenário, apenas 222 pacientes permaneceram no estudo, pois quatro pacientes foram excluídos: um por ter participação duplicada na pesquisa, dois por troca de amostras de soro e um por ser menor de idade.

5.1 Caracterização sócio-demográfica e laboratorial

Sabe-se que os aspectos sociais como a desigualdade, a fome e a pobreza têm sido fontes de manutenção e disseminação da TB, sendo assim, alguns aspectos sócio-demográficos foram inferidos para melhor caracterizar a população em estudo.

No estudo realizado por Young et al. (2014), os autores identificaram que os fatores socioeconômicos estão relacionados ao estado TB, já que os mesmos analisaram a transição de TB latente para TB pulmonar (estudo de coorte). Neste caso, os autores encontraram significância estatística na análise associada ao estado civil, ao diabetes e ao tabagismo.

Nesse estudo, maior frequência de casos novos de TB foi constatada, nesse estudo, entre o sexo masculino (cerca de 60%) e com idade média de 39 anos (conforme Tabela 4). Na análise sobre a variável sexo, muitos estudos relatam a predominância do sexo masculino em pacientes sob tratamento da TB (SINGH et al., 2009, AZUMA et al. 2013, JUNG et al.,

2015). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), os homens, provavelmente, estão mais expostos à bactéria devido a situações de risco, como o uso de tabaco e álcool, além dos mesmos procurarem com menos frequência os serviços de saúde, afastando o diagnóstico precoce da doença. O resultado encontrado também pode ser explicado pelo fato das mulheres utilizarem com maior frequência os serviços de saúde, serem mais perceptivas quanto aos sintomas das doenças e terem menos resistência na utilização de medicamentos do que os homens (MENDOZA-SASSI & BERIA, 2001; LOYOLA et al, 2005).

Ao analisar a faixa etária (Tabela 4), confirma-se o predomínio da doença na fase jovem (em torno dos 29 anos), como demonstrado no estudo de Ruffino-Netto (2002), o qual constata que os pacientes mais atingidos são adultos jovens, na fase mais produtiva de suas vidas. Dado que gera um impacto socioeconômico nas famílias dos pacientes, já que os mesmos por um certo período se ausentam do emprego, comprometendo a renda familiar.

Quanto à raça, constata-se a predominância da raça parda (73%), o que se deve a miscigenação racial própria da região, e sobre a naturalidade, aproximadamente 88% da população estudada é natural do Amazonas, já que o estudo foi conduzido na capital do Estado (Tabela 4).

Em relação ao estado civil, 54% da população estudada auto declarou-se como solteira, dado que se assemelha ao encontrado na população mexicana, os quais afirmam que o estado civil é uma variável preditora da doença (TB pulmonar), já que indivíduos com TB são menos casados ou em união estável do que pacientes com TB latente (YOUNG et al., 2014).

Em relação à classe econômica, o maior número de casos deste estudo foi entre as classes C1 e C2 (n=129), somando 58,1% da população estudada, caracterizando uma população de relativo poder aquisitivo (classe média baixa). Segundo estudo recente com

pacientes diagnosticados com TB e atendidos em unidades da atenção básica na cidade de Manaus, foi observada a prevalência das classes C e D, 48,8 % e 38,1 %, respectivamente (BRAGA et al., 2012). Observou-se uma maior diferença entre as classificações econômicas da rede de assistência básica, os quais em sua maioria são de classes mais baixas e, no caso do presente estudo, a maioria dos pacientes são da classe C, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Perfil dos pacientes do estudo

	n	%
Sexo		
Masculino	133	59,9
Idade Média (18-87 anos)	39 + 16,4	-
Peso médio (29-130Kg)	59,09 ± 12,2	-
Índice de massa corporal (Kg/m²)	21,85 ± 4,24	-
Cor da pele		
Pardo	162	73,0
Naturalidade		
Amazonas	195	87,8
Estado civil		
Solteiro	120	54,1
Classe Econômica (ABEP)		
C1	54	24,32
C2	75	33,78
Fumo	21	9,5
Álcool	77	34,7
Drogas	51	23,0
Diabetes	41	18,5

N=222

ABEP – Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa

TB – Tuberculose

As associações entre variáveis socioeconômicas com incidências de casos de TB são bons indicadores da estratificação social e, por conseguinte, são preditivas das condições de saúde de uma população, segundo Pedruzzi e Valente (2012). Os autores revelam também que o padrão de risco é pior para indivíduos pertencentes a grupos sociais menos favorecidos.

A hepatotoxicidade é o efeito adverso mais comum em pacientes que recebem tratamento antituberculose, levando a um abandono do uso de 11% em pacientes que fazem uso da combinação de INH, RFP e PZN, segundo Schaberg et al. (1996). Aithal et al. (2011) afirmam que, em aproximadamente 2% dos pacientes tratados com regimes terapêuticos incluindo INH, há aumento considerável das aminotransferases, o que configura a hepatotoxicidade e a LHIF – antiTB, frequentemente associada a sintomas com icterícia e náuseas.

Com relação aos dados laboratoriais, foram testados parâmetros bioquímicos de avaliação da função hepática por se tratar de uma farmacoterapia hepatotóxica. A análise da função hepática foi realizada usando-se a avaliação dos valores de transaminases AST e ALT e bilirrubina total, pois estes dados permitem identificar o surgimento de hepatotoxicidade induzida por medicamentos (AGUAYO & RODRIGUEZ, 2011; SOTSUKA et al, 2011 e LIMA & MELO, 2012). Neste estudo, a hepatotoxicidade é confirmada laboratorialmente como a presença de um ou mais parâmetros anormais, dentre AST, ALT e bilirrubina total.

Dos critérios para a classificação de hepatotoxicidade, considerou-se a elevação de até duas vezes o limite superior de referência dos valores de AST e/ou ALT, como paciente normal (AGUAYO & RODRIGUEZ, 2011; SOTSUKA et al, 2011 e LIMA & MELO, 2012). As concentrações de AST ou ALT maior que três vezes o limite normal superior com o aumento de duas vezes o limite normal superior de bilirrubina total, classifica-se como hepatotoxicidade, bem como a elevação de cinco vezes os valores do limite de referência superior de AST ou ALT, considerou-se hepatotoxicidade. Além disso, em todos níveis de classificação não foram considerados o surgimento de sinais e sintomas associados, tais como: náuseas, vômitos, febre, dor de cabeça e icterícia.

No presente estudo, foram encontrados os valores médios para AST de 27,58 U/I (8-212 U/I \pm 26,46), para ALT de 26,64 U/I (3-192 U/I \pm 27,51), para albumina de 3,96 g/dL

(2,38–4,38 g/dL \pm 0,4456), para bilirrubina total de 0,434 mg/dL (0,09-12 mg/dL \pm 0,800) e para hemoglobina glicada de 6,33% (0-18,7% \pm 2,69). Sendo que pelos critérios abordados, somente em sete indivíduos (3,15% da população estudada) foram observados parâmetros bioquímicos alterados para hepatotoxicidade. Entretanto, não foi verificada a hepatotoxicidade prévia, ou seja, anterior ao início do tratamento, para assim sugerir que essa reação está diretamente relacionada ao tratamento com fármacos anti-TB.

Segundo Saukkonen et al. (2006), as drogas anti-TB só poderão ser suspensas, ou modificadas para tratamento alternativo, se a elevação de ALT para alguns indivíduos estiver três vezes o limite superior na presença de sintomas (hepatite e/ou icterícia) ou cinco vezes o limite superior sem sintomas. Como não foram relatados sinais e sintomas por nenhum dos 222 pacientes entrevistados, somente foram considerados pacientes com HIF-antiTB sete indivíduos, os quais foram sugeridos uma nova avaliação médica para verificação dos sintomas de hepatotoxicidade e/ou lesão hepática.

5.2 Determinação das concentrações séricas dos fármacos

As concentrações séricas foram determinadas pela técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem. A combinação da capacidade de separação da cromatografia permite que compostos “puros” sejam introduzidos no espectrômetro de massas e, com a capacidade de identificação do mesmo, muitos compostos com o mesmo tempo de retenção são diferenciados pelo espectro de massa (ARDREY, 2006).

Nesse levantamento, os níveis plasmáticos dos medicamentos foram dicotomizados em normal se estivessem dentro ou acima dos níveis normais e subterapêutico se estivessem

abaixo do nível estipulado como normal, conforme estudo recentemente publicado por Park et al. (2016).

No presente estudo, aproximadamente 40,9% dos pacientes apresentaram níveis séricos reduzidos para um dos fármacos testados (INH, RFP, EB e PZN). Dado semelhante foi encontrado na população sul coreana no estudo de Um et al. (2007), com a prevalência de baixas concentrações em 69 pacientes sob tratamento foi de 46,4% (concentração pós dose de 2 horas).

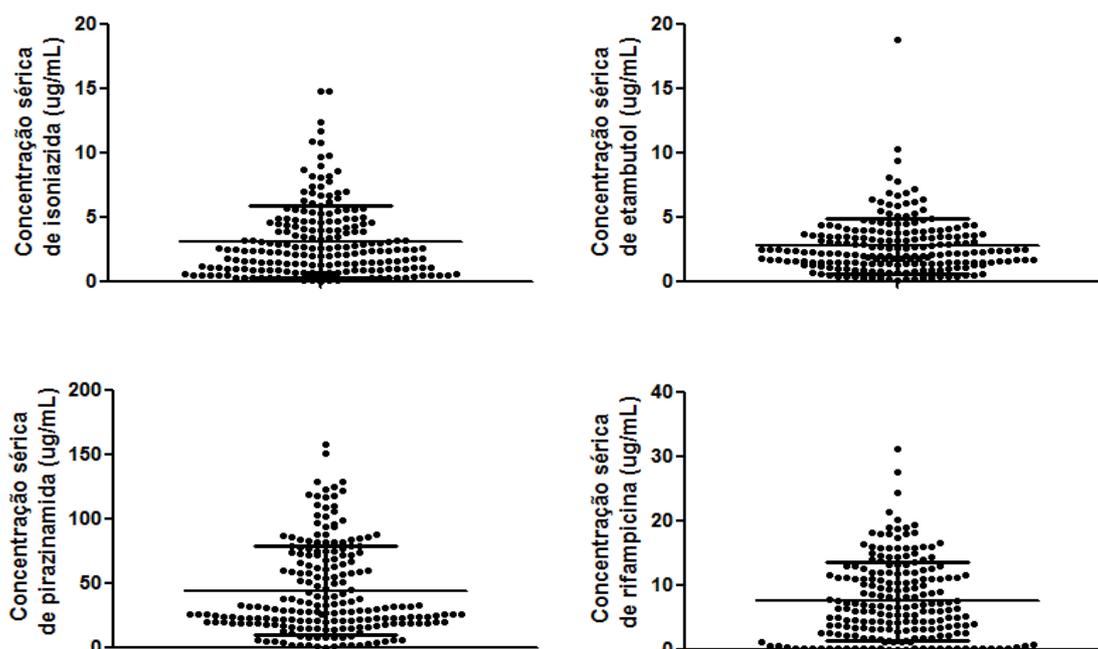


Figura 7: Distribuição das concentrações séricas dos fármacos INH, EB, PZN e RFP encontradas nos pacientes estudados. Fonte: GraphPad Prism 6.

Conforme demonstrado na figura 7, as amostras analisadas, em sua maioria, se encontravam dentro ou abaixo da faixa terapêutica estipulada em 2002 por Peloquin, conforme descrito na Tabela 2 (pág.49). Observou-se também, uma pequena parcela pertencente à concentração sérica elevada, no entanto, no presente estudo, essa minoria foi englobada na faixa de concentração considerada normal.

As altas prevalências de níveis séricos subterapêuticos encontradas no presente estudo possuem proximidade as pesquisas realizadas no Brasil e também nos mais diversos países, apesar de o presente levantamento ter algumas limitações quanto a observar a questão da absorção tardia, utilizando maior número de coletas pós – dose, e/ou verificar a presença de resistência bacteriana aos fármacos; fatores que poderiam contribuir para a elucidação dessas altas prevalências de baixos níveis terapêuticos.

Com relação aos fármacos INH e RFP, os níveis plasmáticos foram subterapêuticos em 60,8% e 58,6%, respectivamente, na população estudada (Figura 8). As médias das concentrações foram para INH 3,08 $\mu\text{g/mL}$ (0,0146-14,76 $\mu\text{g/mL} \pm 2,77$) e RFP 7,40 $\mu\text{g/mL}$ (0,006-31,11 $\mu\text{g/mL} \pm 5,98$).

Os resultados encontrados foram semelhantes ao estudo realizado nos Estados Unidos, o qual incluiu 42 pacientes com respostas lentas para tratamento e demonstrou que 50% a 60% dos pacientes tinham baixas concentrações de INH e RMP (HEYSELL et al, 2010). Outro estudo, realizado no Canadá, mostrou que os níveis séricos de INH e RMP foram baixos em 76,6% e 68,4% dos pacientes, respectivamente (VAN TONGEREN et al, 2013).

Nos achados de Jung et al (2015), na população sul-coreana, 47,7% dos pacientes se encontraram fora dos limites terapêuticos para INH, destes 22,2% (n=34) tiveram baixas concentrações e 25,5%, altas concentrações para o mesmo fármaco. Frequências altas também foram verificadas na população sul coreana em um estudo da Universidade Nacional de Seoul, em que 59,9% da população tiveram baixas concentrações de INH (PARK, et al 2016).

Peloquin (2002) afirma que para muitas drogas a amostra coletada após 2h da última tomada pode ser coletada para estimar a concentração máxima (pico plasmático). No entanto, a variabilidade na absorção oral faz com que um único ponto de tempo coletado possa

influenciar na quantificação da concentração de pico real de alguns fármacos. O autor afirma também que uma segunda coleta após 6h da última tomada permite mensurar sobre taxa e integridade da absorção. Portanto, caso ambos valores (2h e 6h) estiverem abaixo dos intervalos esperados, uma má absorção pode ser confirmada.

A absorção dos fármacos de primeira escolha contra TB é melhor observada pela medida da área sob a curva do que a medida da concentração em 2 horas pós-dose, como também descrito pelos estudos de Akkerman et al. (2014) e Sturkenboom et al. (2015). No entanto, no presente estudo, devido a questões de tempo e logística, o monitoramento através de duas ou mais coletas não foi possível, podendo assim, se ter uma lacuna para elucidação das baixas concentrações desses fármacos.

Quantos aos fármacos EB e PZN, os níveis plasmáticos dos pacientes se mostraram dentro dos níveis normais, 83,3% e 72,5%, respectivamente (Figura 7), tendo como médias para EB 2,73 $\mu\text{g/mL}$ (0,036-18,79 $\mu\text{g/mL} \pm 2,10$) e PZN 44,52 $\mu\text{g/mL}$ (0-157,50 $\mu\text{g/mL} \pm 34,68$). No estudo de Tostmann et al. (2013) nenhum dos pacientes tiveram C_{max} abaixo dos níveis de referência para os fármacos EB e PZN, enquanto que as prevalências das baixas concentrações para estes fármacos em várias populações variam de 12,8 – 32% e 4,5-30%, respectivamente. (UM et al, 2007; BABALIK, et al. 2011; BABALIK et al. 2013 e PARK et al. 2016).

A absorção do EB é descrita ser de primeira ordem ou absorção de ordem zero, provavelmente devido à ligação ou quelação no trato gastrointestinal, o qual pode passar por processos de absorção consecutivos e assim comprometer a medição da concentração sérica real quando se tem somente um ponto de coleta (PELOQUIN et al. 1999 e ZHU et al. 2004). Em um estudo realizado na população sul-africana, os autores descreveram dois grupos de indivíduos quanto a velocidade de absorção do fármaco, os de absorção rápida: concentração

máxima atingida em 2 horas, e os de absorção lenta: concentração máxima obtida entre 3 a 4 horas (JONSSON et al., 2011).

Entretanto, ao estratificar os níveis séricos dos fármacos anti-TB em três níveis abaixo, normal e elevado, as frequências de níveis séricos elevados foram 1,4 %, 11,3%, 5,4% e 27,9% para RFP, INH, EB e PZN respectivamente. O fármaco com maior frequência de níveis elevados foi a PZN, um resultado instigante por se tratar de um dos fármacos mais hepatotóxicos dentre os elencados para o tratamento da TB no Brasil.

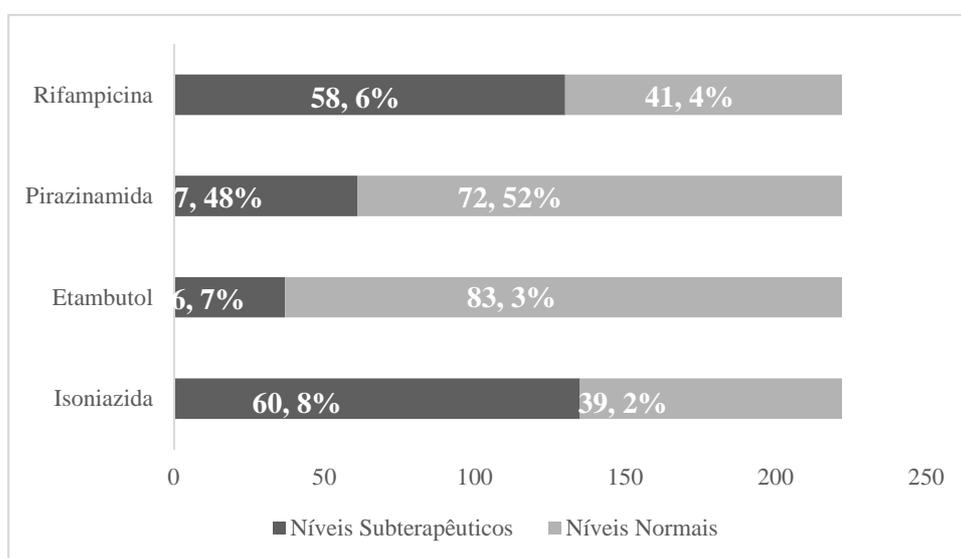


Figura 8: Classificação dos níveis terapêuticos dos fármacos INH, RFP, EB e PZN pertencentes ao DFC utilizado no tratamento da TB.

INH – isoniazida
 RFP – rifampicina
 EB – etambutol
 PZN – pirazinamida
 DFC – dose fixa combinada
 TB – tuberculose

Poucos estudos relatam níveis séricos elevados para os antituberculosos de primeira linha, como descrito no estudo de coorte de McIlleron et al. (2006), onde alguns indivíduos tiveram aumento dos níveis plasmáticos de PZN, EB e INH, contrastando, em parte, ao que foi encontrado nesse levantamento e em outros estudos com as mais diversas populações.

As questões farmacocinéticas e também genéticas devem ser levadas em consideração quando se compara duas populações diferentes. No entanto, para o fármaco PZN, a absorção é descrita como de primeira ordem, bem como a eliminação (PELOQUIN, 2002), podendo haver, em algumas populações como a sul-africana (WILKINS et al. 2006), pacientes de absorção rápida e de absorção lenta, o que também não foi possível relatar no presente estudo.

Desta forma, um estudo mais aprofundado do comportamento farmacocinético dos fármacos anti-TB na população em estudo poderia melhor elucidar os achados nesse levantamento.

5.3 Determinação genotípica

Como descrito na metodologia, os resultados das análises moleculares foram obtidos por PCR em tempo real, o qual após duas horas se tem resultados da amplificação gênica e determinação genotípica. Foram estipulados 55 ciclos no termociclador para a visualização da curva de amplificação como demonstrado na Figura 9.

Nesse levantamento, a maior frequência verificada foi de 20,27% (n=45) para NAT2*7. Enquanto que para os outros genótipos 9,91% (n=22) para NAT2*5, 0,90% (n=2) para NAT2*6 e 10,36% (n=23) para NAT2*12 na população estudada.

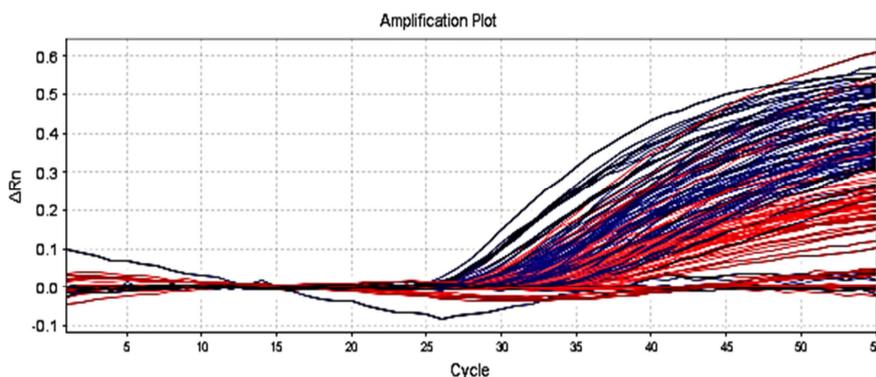


Figura 9: Curva de amplificação gênica para o polimorfismo NAT2*12.

Em comparação a estudos realizados no Brasil (TEIXEIRA, et al. 2009 e TALBOT, et al. 2010), as frequências dos alelos de NAT2 para fenótipo de acetiladores lentos (NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7) se divergem, já que as mesmas ficam em torno de 30 a 40%.

Essas variações nas frequências de genótipos entre as populações existem e deve-se a heterogeneidade étnica, constatada no próprio estudo de Igumnova et al. (2016), quando os autores fizeram a genotipagem em letões e russos, onde para os alelos NAT2*6, NAT2*5 e NAT2*4 foram 0,388%, 0,337%, 0,184% e 0,400%, 0,250%, 0,217%, respectivamente.

O Brasil é um país de uma pluralidade étnica, pois possui populações miscigenadas em todo o seu território. Essas populações foram genotipadas no estudo de Talbot et al (2010), onde os autores estudaram cinco polimorfismos comuns (G191A, C481T, G590A, A803G e G857A) em três grupos étnicos, afro-brasileiros, brancos e ameríndios no nordeste do Brasil. Os autores, ao compararem as populações, verificaram que a distribuição das frequências para o alelo NAT2*6 (G590A) foram maiores (OR = 3,714; 95%CI = 0,28-8,54; p = 0,040) em ameríndios do que em afro-brasileiros e brancos.

Sabe-se que a raça é uma variável extremamente importante que influencia a saúde do indivíduo nas mais diversas formas, como no desenvolvimento de doenças crônicas, ausência de resposta ou reações adversas ao tratamento farmacológico (TALBOT et al. 2010). Neste sentido, a influência da raça na distribuição dos polimorfismos da NAT2 é bem relatada na literatura, já que vários estudos reportam as mais diversas frequências desses polimorfismos nas diversas etnias (SINGH et al. 2009; RAMACHANDRAN & SWAMINATHAN, 2012; SOON NG et al. 2014; JUNG et al. 2015).

Como já abordado na revisão da literatura (tópico 3.5.1 – A enzima N-acetiltransferase), a capacidade da enzima realizar a acetilação no metabolismo do fármaco INH é comprometida, à medida que ocorram mutações no gene que codifica a mesma. O

comprometimento da ação é traduzido pelos fenótipos de acetilação: lento, intermediário e rápido.

O estado da atividade da NAT2 depende do número de alelos ativos (NAT2*4, NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, NAT2*12 etc.) e a classificação fenotípica segue o mesmo princípio, como demonstrado nos estudos de Singh et al. (2013) e Igumnova et al. (2016). Para uma classificação fenotípica, segundo esses mesmos autores, os indivíduos são classificados como acetiladores rápidos, caso possuam duas mutações para alelos rápidos (NAT2*4, NAT2*11, NAT2*12, NAT2*13); acetiladores lentos, caso possuam mutações para alelos lentos (NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, NAT2*14), e acetiladores intermediários, quando possuem mutações em um alelo rápido e um alelo lento.

No entanto, nesse levantamento não se pode concluir quanto aos fenótipos da população estudada, devido a poucos polimorfismos vinculados a acetilação rápida serem genotipados, o que poderia levar a uma conclusão equivocada nessa população. Desta forma, optou-se por descrever apenas a análise genotípica destes polimorfismos.

5.4 Associação entre fatores sócio-demográficos, laboratoriais, genéticos e concentrações séricas

É perceptível que as baixas concentrações dos fármacos anti-TB são detectadas nas mais diversas populações, principalmente dos fármacos INH e RFP, os quais são imprescindíveis na terapia, já que os mesmos no esquema básico de TB pulmonar permanecem durante os 6 meses mínimos de tratamento. No entanto, poucos estudos evidenciam associações de fatores externos e/ou internos com as concentrações desses fármacos.

No presente estudo, ao verificar associação entre os fatores sócio-demográficos e as concentrações dos fármacos, somente para o fármaco INH foi obtida alguma associação com significância estatística (Tabela 5). Houve uma maior frequência de solteiros com baixas concentrações plasmáticas do fármaco ($p=0,044$), de pessoas com ensino médio/superior ($p=0,028$) e de etilistas com $p=0,038$.

Para a RFP, observou-se uma tendência a associação das baixas concentrações com pessoas que possuem o ensino médio/superior, no entanto sem significância estatística ($p=0,063$). Para os demais fármacos, não se obteve associação com os fatores sócio-demográficos.

Como já relatado nessa discussão, o estado civil solteiro foi citado no estudo de Young et al (2014) como fator preditor da doença TB, mas não vinculado a níveis subterapêuticos de INH. Supõe-se que indivíduos solteiros por, geralmente, não terem aporte familiar (cônjuge, mãe etc), não aderem ao tratamento da TB, obtendo assim baixas concentrações de algum fármaco anti-TB. No entanto, esse resultado pode estar vinculado a questões de amostragem, já que no período de coleta de dados, a maior frequência de solteiros foi constatada.

Em um estudo realizado no Iêmen, a questão do aporte familiar foi verificada, onde se constatou ser um fator de risco para a não adesão ao tratamento nessa população (ANAAM et al 2013). Em outros três estudos realizados na Argentina (ARROSSI et al 2012; HERRERO et al, 2015a; HERRERO et al, 2015b), diversos fatores sociais foram associados ao risco da não adesão (como o sexo masculino, custos de transporte, falta de saneamento básico etc.), no entanto, nenhum deles associam a não adesão ao tratamento ao estado civil.

A escolaridade é tida como fator preditor da não adesão ao tratamento em vários estudos (GARRIDO et al. 2012; ANAAM et al. 2013). No entanto, ao menor nível de

escolaridade, ou seja, ao analfabetismo e não a pessoas que possuem certo grau de conhecimento.

Alguns fatores independentemente associados com as concentrações das drogas antituberculosas foram identificados por McIlleron et al (2006), em um estudo de coorte em sul-africanos. A infecção pelo HIV foi associada com a redução de 39% e 27% das concentrações de RFP e EB, respectivamente; fatores relacionados a formulação (mono ou DFC) foram determinantes para a biodisponibilidade da RFP e INH, além das pacientes do sexo feminino obtiverem níveis elevados de RFP e INH. Diferentemente deste estudo, estes fatores não tiveram associação com os níveis séricos dos fármacos anti-TB.

Pessoas vivendo com HIV/SIDA, privados de liberdade, pessoas em situação de rua e indígenas apresentam maior risco de adoecimento por tuberculose, devido às condições de saúde e de vida a que estão expostos (WHO, 2014). Porém, o uso de bebidas alcoólicas, o fumo e o uso de drogas de abuso também são fatores de risco. No presente levantamento, o relato de consumo diário ou 02 a 03 vezes por semana, tanto de álcool quanto de cigarro, pelos pacientes sob tratamento de TB, os classificou como etilistas e/ou tabagistas.

Dos 222 pacientes entrevistados, 90,54% afirmaram não fumar. No entanto, os vinte e um pacientes, que afirmaram ainda fazer uso do fumo sob tratamento da TB, registraram níveis subterapêuticos em três fármacos RFP (n=15), INH (n=14) e PZN (n=8). Porém, não foi constatada nenhuma associação de fumantes aos baixos níveis séricos dos fármacos anti-TB (Tabela 5).

Desde 1918, o tabagismo é relatado como fator de risco para TB e foi confirmada sua associação com a TB doença, recidiva da TB e mortalidade em uma revisão sistemática conduzida pela OMS (BRASIL,2011). O fumo afeta os mecanismos de defesa da árvore

respiratória, colaborando para a gravidade das lesões necrotizantes, dificultando a cicatrização.

Nesse levantamento, o consumo de bebidas alcoólicas relatado durante o tratamento da TB teve uma frequência maior. Setenta e sete indivíduos (34,68%) faziam uso de álcool após o início do tratamento, sendo que níveis subterapêuticos em dois fármacos RFP (n=50) e INH (n=54) foram registrados. Neste estudo, obteve-se associação às baixas concentrações somente do fármaco INH com etilistas (p=0,038).

O etilismo crônico é considerado importante fator de risco para o desenvolvimento da doença, visto que há alta incidência de casos e de formas mais avançadas de TB pulmonar entre esses pacientes. O abandono do tratamento e o risco de desenvolvimento de efeitos colaterais aos medicamentos anti-TB pelos etilistas são maiores quando comparados aos não-etilistas (WHO, 2014).

No estudo de Mason et al. (2004), sobre as consequências do consumo de álcool em animais infectados pelo Mtb, os resultados demonstraram formação de granulomas pulmonares mais exacerbada e por consequência, comprometimento da formação e crescimento das células de defesa do órgão. Tais achados comprovaram que o consumo de álcool afeta a imunidade dos pulmões, facilitando sua contaminação por microrganismos oportunistas.

A diabetes não controlada está associada a inúmeras complicações, como doenças vasculares, neuropatias e aumento da susceptibilidade a infecções. A hiperglicemia e a diminuição da insulina interferem com a resposta imunológica, agindo diretamente na função celular dos macrófagos e dos linfócitos e alterando a função quimiotática, a fagocitose e a apresentação de antígenos (DOOLEY, et al, 2009).

Inúmeros estudos de caso-controle demonstram que o risco de um paciente diabético desenvolver tuberculose varia de 2,44 a 8,33, comparado com um paciente não diabético, como descrito na revisão sistemática de Rawat et al. (2011). Em relação à gravidade da diabetes, pacientes insulino-dependentes apresentam um maior risco de apresentar tuberculose.

No estudo de Babalik et al (2013), as concentrações séricas de INH e RFP foram menores em pacientes diabéticos em comparação com pacientes não-diabéticos em 49% (n=14; p <0,001) e 66% (n=14; p <0,05), respectivamente. Diferentemente ao encontrado por Requena-Mendéz et al. (2012), onde nem a absorção retardada e nem as baixas concentrações do fármaco RFP tiveram diferenciação entre grupos com DM e/ou HIV. No presente levantamento, também não houve associação estatisticamente significativa da presença de DM auto referida e os baixos níveis séricos dos fármacos anti-TB.

Para os marcadores bioquímicos não foram evidenciadas associações com os níveis terapêuticos dos fármacos anti-TB (Tabela 6). No entanto, para o fármaco PZN observou-se uma certa tendência das aminotransferases (AST e ALT) quando associadas aos níveis terapêuticos desse fármaco (p=0,0675 e p=0,0545 respectivamente), porém sem significância estatística.

A tendência verificada sugere uma provável instalação do efeito adverso hepatotoxicidade, bem comum em pacientes sob tratamento da TB. Entretanto, como uma coleta anterior ao tratamento não foi realizada e dados clínicos sobre sinais e sintomas não foram coletados dos pacientes, portanto, não se pode concluir sobre esse desfecho. A hepatotoxicidade e a lesão hepática têm sido mais associadas aos polimorfismos das enzimas NAT2, ou seja, diretamente ligadas ao metabolismo da INH e não a PZN, mesmo o último sendo um dos fármacos mais hepatotóxicos (MAHMOUD et al. 2012; AZUMA et al. 2013).

Do total de duzentas e vinte e duas amostras coletadas no estudo, a genotipagem para NAT2 foi realizada em 207 amostras para os quatro alelos citados (NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 e NAT2*12). Diversos fatores como: extração de dNA incorreta, perda de amostra e troca de amostra, contribuíram para a não realização da genotipagem dessas quinze amostras.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar associação entre os genótipos NAT2 e as concentrações séricas da Isoniazida, no entanto, através do método não foi verificada associação estatística significativa entre os mesmos ($p=0,05$), conforme demonstrado na Figura 10.

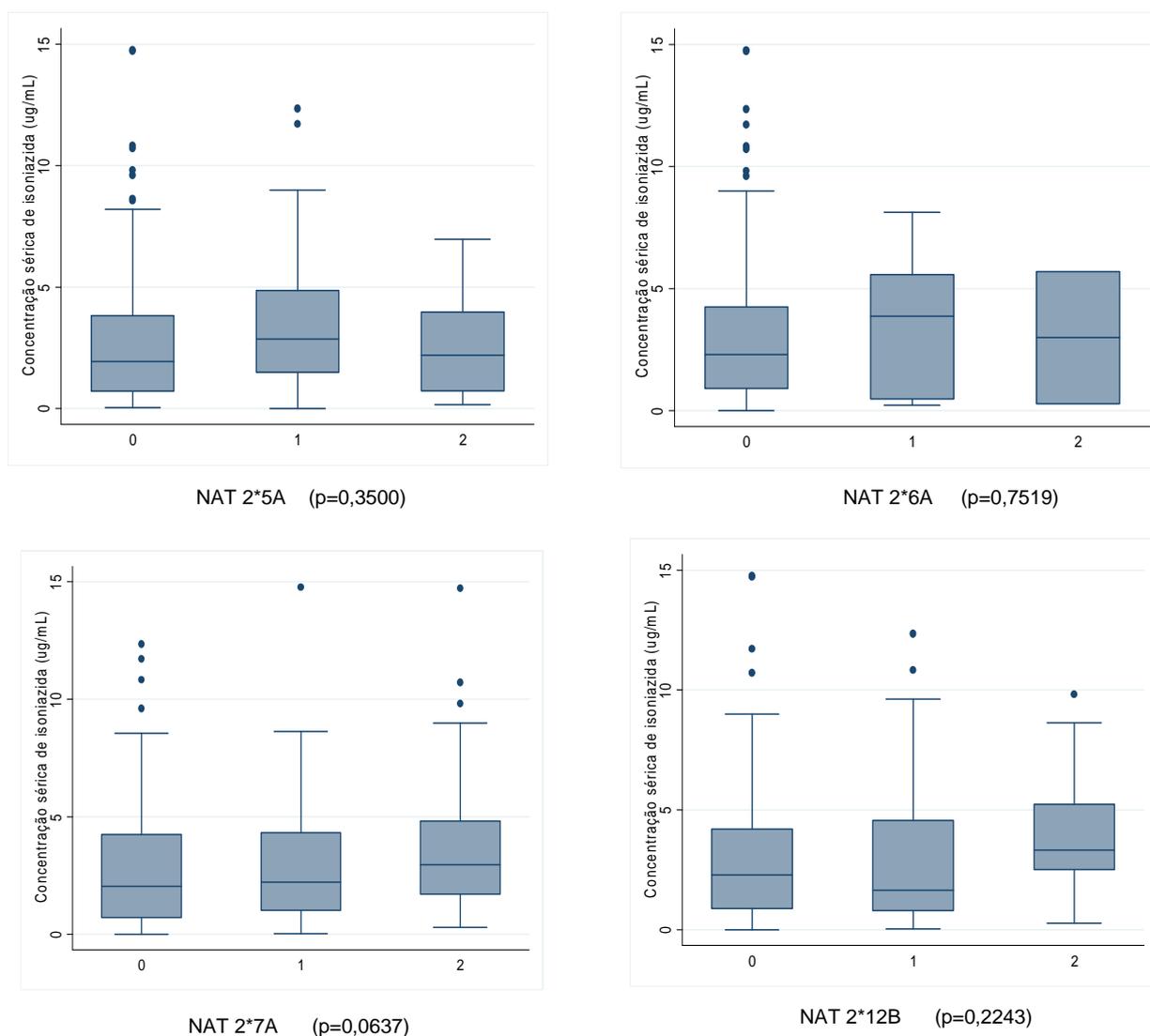


Figura 10: Associação entre os genótipos e as concentrações séricas de INH por ANOVA ($p=0,05$).
Legenda: 0 – normal; 1 – mutação em heterozigose, 2 – mutação em homozigose.

O impacto das concentrações séricas no desfecho do tratamento da TB foi avaliado em dois estudos, utilizando como parâmetro a cultura do escarro (BURHAN et al., 2013; PARK et al., 2016). No estudo de Burhan et al. (2013), os autores constataram as baixas concentrações na população indonésia, no entanto, a resposta ao tratamento é boa. Enquanto, no estudo de Park et al. (2016), as baixas concentrações de INH não tiveram associação a resposta ao tratamento, o que sugere uma reavaliação das concentrações séricas dos fármacos anti-TB tidas como referência para a população.

Tabela 5 – Relação entre as características dos pacientes e o nível sérico dos fármacos estudados

	N. (%)* DOS PACIENTES DE ACORDO COM O NÍVEL SÉRICO (N=222)											
	INH			RFP			EB			PZN		
	ABAIXO (n=135)	NORMAL (n=87)	P valor	ABAIXO (n=130)	NORMAL (n=92)	P valor	ABAIXO (n=37)	NORMAL (n=185)	P valor	ABAIXO (n=61)	NORMAL (n=161)	P valor
SEXO												
MASCULINO	60 (81)	59,77 (52)		63,08 (82)	55,43 (51)		51,35 (19)	61,62 (114)		59,02 (36)	60,25 (97)	
FEMININO	40 (54)	40,23 (35)	0,973	36,92 (48)	44,57 (41)	0,252	48,65 (18)	38,38 (71)	0,245	40,98 (25)	39,75 (64)	0,867
IDADE	38,13 ± 15,7	40,42 ± 17,4	0,311	37,8 ± 15,8	40,7 ± 17,1	0,187	36,1 ± 15,6	39,6 ± 16,5	0,241	36,8 ± 14,4	39,8 ± 17	0,221
IMC	22,08 ± 4,3	21,45 ± 4,1	0,278	21,07 ± 4,2	21,9 ± 4,3	0,853	21,3 ± 4,84	21,9 ± 4,11	0,4322	21,49 ± 4,9	21,96 ± 3,96	0,463
ESTADO CIVIL												
SOLTEIRO	55,56 (75)	51,72 (45)		56,15 (73)	51,09 (47)		62,16 (23)	52,43 (97)		55,74 (34)	53,42 (86)	
CASADO	39,26 (53)	33,33 (29)	0,044	33,85 (44)	41,3 (38)	0,494	37,84 (14)	36,76 (68)	0,103	40,98 (25)	35,40 (57)	0,175
DIVORCIADO/VIÚVO	5,19 (7)	14,94 (13)		10 (13)	7,61 (7)		0	10,81 (20)		3,28 (2)	11,18 (18)	
RAÇA												
NEGRO	14,81 (20)	17,24 (15)		16,15 (21)	15,22 (14)		13,51 (5)	16,22 (30)		19,67 (12)	14,29 (23)	
BRANCO	13,33(18)	8,05 (7)	0,456	11,54 (15)	10,87 (10)	0,965	16,22 (6)	10,27 (19)	0,561	13,11 (8)	10,56 (17)	0,484
PARDO	71,85 (97)	74,71 (65)		72,31 (94)	73,91 (68)		70,27 (26)	73,51 (136)		67,21 (41)	75,16 (121)	
ESCOLARIDADE												
ANALFABETO/4ªSERIE	25,19 (34)	41,38 (36)		26,92 (35)	38,04 (35)		27,03 (10)	32,43 (60)		29,51 (18)	32,30 (52)	
FUNDAMENTAL	27,41 (37)	17,24 (15)	0,028	28,46 (37)	16,30 (15)	0,063	29,73 (11)	22,16 (41)	0,584	26,23 (16)	22,36 (36)	0,817
COMPLETO												
ENSINO												
MÉDIO/SUPERIOR	47,41 (64)	41,38 (36)		44,62 (58)	45,65 (42)		43, 24 (16)	45,41 (84)		44,26 (27)	45,34 (73)	
CLASSE ABEP												
A/B	25,19 (34)	24,14 (21)		22,31 (29)	28,26 (26)		27,03 (10)	24,32 (45)		27,87 (17)	23,60 (38)	
C	59,26 (80)	56,32 (49)	0,744	59,23 (77)	56,52 (52)	0,557	62,16 (23)	57,30 (106)	0,536	52,46 (32)	60,25 (97)	0,575
D/E	15,56 (21)	19,54 (17)		18,46 (24)	15,22 (14)		10,81 (4)	18,38 (34)		19,67 (12)	16,15 (26)	
TABAGISTAS	10,37 (14)	8,05 (7)	0,563	11,54 (15)	6,52 (6)	0,208	8,11 (3)	9,73 (18)	0,758	13,11 (8)	8,07 (13)	0,252
ETILISTAS	40 (54)	26,44 (23)	0,038	38,46 (50)	29,35 (27)	0,160	24,32 (9)	36,76 (68)	0,147	31,15 (19)	36,02 (58)	0,496
DIABETES**	18,52 (25)	18,36 (16)	0,981	15,38 (20)	22,83 (34)	0,159	18,92 (7)	18,38 (34)	0,938	13,11 (8)	20,50 (33)	0,206

*Dados apresentados como % ou média ± DP exceto quando indicado. ** Diabéticos autoreferidos.

Tabela 6 – Marcadores bioquímicos dos pacientes de acordo com o nível sérico

	INH			RFP			EB			PZN		
	ABAIXO (n=135)	NORMAL (n=87)	P valor	ABAIXO (n=130)	NORMAL (n=92)	P valor	ABAIXO (n=37)	NORMAL (n=185)	P valor	ABAIXO (n=61)	NORMAL (n=161)	P valor
ALBUMINA (G/DL)	3,94 ± 0,46	3,98 ± 0,41	0,5736	3,97 ± 0,42	3,93 ± 0,47	0,5146	3,88 ± 0,38	3,97 ± 0,45	0,2475	3,93 ± 0,46	3,97 ± 0,43	0,5419
AST (U/I)	27,2 ± 25,5	28 ± 27,94	0,8317	27 ± 28,5	28,3 ± 23,4	0,7344	29,5 ± 33,4	27,2 ± 24,9	0,6285	22,3 ± 11,9	29,5 ± 29,9	0,0675
ALT (U/I)	26,2 ± 26,1	27,1 ± 29,5	0,8127	25,6 ± 26,2	28 ± 29,2	0,5394	27,7 ± 31,9	26,4 ± 26,6	0,7941	20,8 ± 14,4	28,8 ± 30,8	0,0545
BILIRRUBINA TOTAL (MG/DL)	0,46 ± 1	0,39 ± 0,15	0,5279	0,44 ± 1	0,41 ± 0,2	0,7716	0,66 ± 1,92	0,38 ± 0,18	0,0594	0,52 ± 1,49	0,39 ± 0,19	0,2813

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que as baixas concentrações dos fármacos utilizados no tratamento contra a tuberculose são uma realidade na população atendida no centro de referência na cidade de Manaus.

Considerando algumas limitações do estudo, principalmente logística, tempo e demanda sazonal, alguns achados devem destaque. Em termos sócio – demográficos, a população em estudo tem delineamento semelhante a populações sob tratamento de TB no mundo a fora e alguns fatores, como escolaridade e estado civil, demonstraram ser fatores de risco para os níveis plasmáticos do fármaco INH. Esse resultado, no entanto, é intimamente ligado a adesão ao tratamento, ou seja, a “tomada” de dose dos fármacos de forma correta e ininterrupta.

A alta prevalência de indivíduos que fazem uso de álcool sob tratamento da TB e que, dentre eles uma boa parcela apresentou baixos níveis séricos de INH, um dos principais fármacos elencados para o tratamento é um fator preocupante; que nos alerta quanto a necessidade de orientação correta e acompanhamento terapêutico adequado desses pacientes.

A não verificação de presença/ausência de hepatotoxicidade prévia ao tratamento comprometeu a confirmação dos casos de hepatotoxicidade ligados ao uso dos anti-TB, sendo assim, não se pode inferir quanto a relação desse efeito adverso e as concentrações desses fármacos. Estudos posteriores serão necessários para confirmar essa possível correlação.

Devido às limitações na execução do projeto, somente alguns genótipos de NAT2 puderam ser estudados nessa população, sem caracterização fenotípica, o que poderia ser um dos fatores que elucidariam as altas prevalências das baixas concentrações plasmáticas de INH na população em estudo, bem como estudos de outras enzimas como a CYP2E1 e/ou

GSTs que também participam do metabolismo desse fármaco e que poderiam ser prováveis explicações das baixas concentrações encontradas.

A frequência dos genótipos de NAT2 encontrada foi de cerca de 30%, correspondendo aos estudos realizados na população brasileira, já que a heterogeneidade étnica é característica dessa população. A análise de variância para verificar possível associação dos genótipos de NAT2 e as concentrações séricas não teve significância estatística ($p=0,05$).

Os resultados da presente dissertação, assim como os dados relatados em outros estudos, evidenciam que as baixas concentrações dos fármacos de primeira linha utilizados para o tratamento da tuberculose são uma realidade, a qual desafiam os pesquisadores pondo em cheque o papel e a utilidade do monitoramento terapêutico dessas drogas. Estudos adicionais devem ser realizados para avaliar o impacto da farmacogenética e da adesão ao tratamento nestes resultados, bem como investigar a influência das baixas concentrações no desfecho do tratamento.

7. REFERÊNCIAS

AGUAYO, M., RODRIGUEZ, J. C. Hígado y terapia antituberculosa. Seção Tuberculose. **Revista Chilena de Enfermidades Respiratórias**, v. 27, p: 53-57, 2011.

AITHAL, G.P; WATKINS, P.B; ANDRADE, R. J; LARREY, D. et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n.6, p: 806-815, 2011.

AKKERMAN, OW., VAN ALTENA R., BOLHUIS MS. et al. Strategy to limit sampling of antituberculosis drugs instead of determining concentrations at two hours postingestion in relation to treatment response. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p:628, 2014.

ALSUNTAN, A. & PELOQUIN, C A. Therapeutic drug monitoring in the treatment of Tuberculosis: an update. **Drugs**, v. 74, p: 839-854, 2014.

ANOAM, M.S., MOHAMED, M.I.I., ALSEROURI, A.W. e ALDOBHANI, A. Factors affecting patients' compliance to anti-tuberculosis treatment in Yemen. **Journal of Pharmaceutical Health Services Research**, v. 4, n. 2; p: 115 – 122, 2013.

ARDREY, BOB. Livro: Liquid Chromatography-mass spectrometry: an introduction. Wiley editora, 3ª edição, 2006.

ARROSSI S., HERRERO M.B, GRECO A. e RAMOS S. Factores predictivos de la no adherencia al tratamiento de la tuberculosis em municipios del Área Metropolitana de Buenos Aires, Argentina. **Salud Coletiva**, v. 8 (supl.), p: 65-76, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA-ABEP. Versão 2014. Disponível em: <http://www.abep.org/criterioBrasil.aspx>. Acesso em 20 de setembro de 2014.

AZUMA, J., OHNO, M., KUBOTA, R., YOKOTA, S. *et al.* 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. **European Journal of Clinical Pharmacology** v. 69, p:1091–1101,2013.

BABALIK, A., ULLUS, I. H., BAKIRCI, N., KUYUCU, T., ARRPAĞ, H., DAGYILDIZI, L., CAPANER, E. Plasma concentrations of Isoniazid and Rifampin are decreased in adult pulmonary tuberculosis patients with Diabetes Mellitus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p.5740-5742, 2013.

BAIETTO, L., CALCAGNOT, A., MOTTA, I., BARUFFI, K. et al. A UPLC-MS-MS method for the simultaneous quantification of first- line antituberculars in plasma and in PBMCs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, p: 2572-2575, 2015.

BARROSO, E. C.; PINHEIRO, V. G. F.; FAÇANHA, M. C.; CARVALHO, M. R.D.; MOURA, M. E.; CAMPELO, C. L.; PELOQUIN, C. A.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Serum concentrations of rifampin, isoniazid, and intestinal absorption, permeability in

patients with multidrug resistant tuberculosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 81, n. 2, p. 322-9, 2009.

BEN MAHMOUD, L., GHOZZI, H., KAMOUN, A., HAKIM, A. *et al.* Polymorphism of the N-Acetyltransferase 2 Gene as a Susceptibility Risk Factor for Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity in Tunisian Patients with Tuberculosis. **Pathologie Biologie**, v. 60, n. 5, p:324–30, 2012.

BLUMBERG, H.M. *et al.* American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and the Infectious Diseases Society. Treatment of Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Nova Iorque; v. 167, p:603-62, 2003.

BOEHME, C.C., NABETA, P. HILLEMANN, D., NICOL, M.P. *et al.* Rapid molecular detection os Tuberculosis and Rifampin resistance. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 363, n. 11, p. 1005-1015, 2010.

BRAGA, J.U. *et al.* Fatores associados ao abandono da tuberculose nos serviços de atenção básica em dois municípios brasileiros. Manaus e Fortaleza, 2006 a 2008. **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.20, n.2: 225-233, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Nota Técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico** v. 47, n. 13, 2016.

BRITO, T C., POSSUELO, L G., TEIXEIRA, R L F.,GREGIANINI, T S., *et al.* Análise de polimorfismos no gene NAT2 em pacientes em tratamento para Tuberculose. In: **Salão de iniciação Científica (17. : 2005 : Porto Alegre, RS). Livro de resumos**. Porto Alegre : UFRGS, 2005.

BURHAN, E., RUENSEN, C., RUSLAMI, R., GINANJAR, A., MANGUENNEGORO, H., ASCOBAT, P., DONDEERS, R., CREVEL, R., AARNOUTSE, R. Isoniazid, rifampin and pyrazinamide plasma concentrations in relation to treatment response in Indonesian pulmonary tuberculosis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p.3614-3619, 2013.

CADE, E. C., DLOUHY, A C., MEDZIHRADSZKY, K. F., *et al.* Isoniazid-resistance conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis KatG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. **Protein Science**, v. 19, p:458-474, 2010.

CAMPOS, W.R.; et al. Intraocular tuberculosis. **Revista Brasileira de Oftalmologia** v.70, n. 6, p: 437-451, 2011.

CHO, HYUN JUNG et al. “Genetic Polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 Associated with Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity in Korean Patients with Pulmonary Tuberculosis.” **Tuberculosis**. v. 87, p:551–56, 2007.

DANIEL, T. M. “The History of Tuberculosis”. **Respiratory medicine**, v.100, p:1862–70, 2006.

DOMINGOS, A; BARBADO, A. Tratamento da Tuberculose Multirresistente, **Tratado de Pneumologia.**, Portugal, 2003.

DOOLEY KE, CHAISSON RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. **Lancet Infectious Diseases**. v. 9, n. 12, p:737-46, 2009.

DU, H., CHEN, X., FANG, Y. YAN, O. et al. Slow N-Acetyltransferase 2 Genotype Contributes to Anti-Tuberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity: A Meta-Analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p:3591–96, 2013.

EGELAND, E F. & PELOQUIN, C A. Pharmacokinetic variability and tuberculosis treatment outcomes, including acquired drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v.55, p: 169-177, 2012.

FORRELAND, M.A., KLEPP, L.I., GIOFFRÉ, A., GARCIA Y SABIO, J. et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v. 4, n.1, p. 3 – 66, 2012.

GARRIDO M.S, PENNA M.L, PERES-PORCUNA T. M. et al. Factors associated with TB treatment default in na endemic area of the brazilian Amazon: A case control study, **PloS One**, v. 7, n. 6, 2012.

GUAOUA, S., RATBI, I., LAARABI, F.Z., ELALAOUI, S.C. et al. Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population. **BMC Genetics**, v. 15, 2014.

HAMDY, S.I.; HIRATSUKA, M.; NARAHARA, K.; ENDO, N.; EL-ENANY, M.; MOURSI, N.; AHMED, M. S.; MIZUGAKI, M. Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. **British Journal of Clinical Pharmacology.**, v. 55, n. 6, p. 560-9, 2003.

HARDMAN J.G, LIMBERD, L.E, MOLINOFF P.B, RUDDON R.W, GILMAN A.G, editores. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996.

HERRERO M.B, RAMOS S., ARROSSI S. Determinantes da não adesão ao tratamentoda TB na Argentina: Barreiras relacionadas com o acesso ao tratamento. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p: 287-296, 2015a.

HERRERO M.B, ARROSSI S., RAMOS S., BRAGA J.U. Determinantes sociais da não-adesão ao tratamento de tuberculose em Buenos Aires, Argentina. **Cadernos de Saúde Pública**, vol.31, n.9, pp.1983-1994, 2015b.

HEYSELL SK, MOORE JL, KELLER SJ, HOUPTE ER.. Therapeutic drugmonitoring for slow response to tuberculosis treatment in a state controlprogram, Virginia, U S A. **Emerg Infect Dis.** , v. 16, p:1546–1553, 2010.

HIRATSUKA, M. Development of simplified and rapid detection assay for genetic polymorphisms influencing drug response and its clinical applications. **Yakugaku Zasshi**, v. 122, n. 7, p. 451-63, 2002.

HUANG, Y.S, CHERN, H.D, SU W.J et al: Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology**. v 35, p:883-889, 2002.

HUANG, Y.S, CHERN H.D, SU WJ et al: Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology**; v.37, p:924-930, 2003.

HUANG Y.S, SU W.J, HUANG Y.H et al: Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H:quinine oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. **Journal of Hepatology**. v. 47, p:128-134, 2007.

HUANG, YI-SHIN. Recent progress in genetic variation and risk of antituberculosis drug-induced liver injury. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 77, p: 169-173, 2014.

JAVADI MR, et al. Adverse reactions of anti- tuberculosis drugs in hospitalized patients: incidence, severity and risk factors. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**; v.16, n.10, p:1104-10, 2007.

JONSSON, S., DAVIDSE, A., WILKINS, J. VAN DER WALT, J-S. et al. Population pharmacokinetics of ethambutol in South African tuberculosis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.9, p: 4320-4237, 2011.

JUNG, J.A., KIM, T., LEE, H., JEONG, B., *et al.* A proposal for an individualized pharmacogenetic-guided isoniazid dosage regimen for patients with tuberculosis. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p: 5433-5438, 2015.

KERB, REINHOLD. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. **Cancer Letters**, v. 234, p: 4-33, 2006.

KITA, T., TANIGAWARA Y., CHIKAZAWA S., et al. N-acetyl transferase-2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n.5, p. 544-549, 2001.

LIMA, C. H. S.; BISPO, M. L. F.; DE SOUZA, M. V. N. Pirazinamida : Um Fármaco Essencial No Tratamento Da Tuberculose. **Revista Virtual da Química**, v. 3, n.3, p: 159-180, 2011.

LIMA, M. F. S., MELO, H. R. L. Hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs among patients coinfecting with HIV and tuberculosis. **Cadernos de Saúde Pública**, v 28, n.4, p: 698-708, Rio de Janeiro, 2012.

LOPES, A. O. Tuberculose um problema de saúde pública: causas do abandono do tratamento. 2010. [**Dissertação de mestrado**]. Centro Universitário São Camilo, São Paulo.

LOYOLA FILHO, A. I., UCHOA, E., FIRMO, J. O. A., LIMA-COSTA, M. F. Estudo de base populacional sobre o consumo de medicamentos entre idosos: Projeto Bambuí. **Cadernos de Saúde Pública**. v.21, n.2, pág. 545-553, 2005.

MAGDOFF, K., THEE, S., SCHAAF, H S., HESSELING, A C. et al. Pharmacokinetics of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in children younger than two years of age with tuberculosis: evidence for implementation of revised World Health Organization recommendations, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 55, n. 12, p: 5560-5567, 2011.

MAGIS-ESCURRA, C.; VAN DEN BOORGARD, J.; IDDEMA, D.; BOEREE, M.; AARNOUTSE, R. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis patients. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, p. 83-6, 2012.

MARREIRO, L.S., CRUZ, M. A., OLIVEIRA, M.N.F., GARRIDO, M.S. Tuberculose em Manaus, Estado do Amazonas: resultado de tratamento após a descentralização. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.18, n.3, p:237-242, 2009.

MATSUMOTO, OHNO & AZUMA. Future of pharmacogenetics-based therapy for tuberculosis. **Pharmacogenomics**, v. 15, n.5, p:601-607, 2015.

MCILLERON, H.; WASH, P.; BURGER, A.; NORMAN, J.; FOLB, P. I.; SMITH, P. Determinants of rifampin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol pharmacokinetics in a cohort of tuberculosis patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1170-7, 2006.

MCILLERON, H.; SMITH, P., DAVIDSE, A.; WILKINS, J. *et al.* Population pharmacokinetics of ethambutol in South African tuberculosis patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4230-4237, 2011.

MCILLERON, H; RAHMAN, S.A; DAVE, J A.; BLOCKMAN, M., OWEN, A. Special populations and pharmacogenetic issues in tuberculosis drug development an clinical research. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. S3, p: S115-125, 2015.

MENDOZA-SASSI, R., BERIA, J. U. Utilización de los servicios de salud: una revisión sistemática sobre los factores relacionados. **Cadernos de Saúde Pública**. V.17, n.4, pág.819-832, 2001.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**., v. 155, p. 335-50, 1987.

MURRAY, Patrick R.; Rosenthal, Ken S.; Pfaller, M. A. **Microbiologia Médica**. 4125 (MOSBY, 2010).

OBBERG, K.C. Adverse drugs reaction. **American Journal Pharmaceutical Education**, v.63, p: 199-204, 1999.

OGA S, CAMARGO M. M. A, BATISTUZZO J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

PAN, J.; XIANG, Q.; BALL, S. Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, n.6, p. 709-13, 2000.

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

PEDRUZZI, B. M., VALENTE, G. S. C. Perfil sócio econômico e sócio demográfico de pacientes com tuberculose: uma revisão integrativa. EEAA/ UFF, 2012.

PELOQUIN, C. A. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. **Drugs**, v. 62, n. 15, p. 2169-83, 2002.

PELOQUIN, C. A. et al. Pharmacokinetics of ethambutol under fasting conditions, with food, and with antacids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p: 568-572, 1999.

POSSUELO, LIA GONÇALVES. Estudo de polimorfismos presentes no gene que codifica N-acetiltransferase 2 e associação com hepatotoxicidade em pacientes com tuberculose tratados com RHZ. 2008. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RAMACHANDRAN, G.; SWAMINATHAN, S. Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis – a review. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 5, p. 89-98, 2012.

RAWAT J, SINDHWANI G, BISWAS D. Effect of age on presentation with diabetes: Comparison of nondiabetic patients with new smear-positive pulmonary tuberculosis patients. **Lung**.v. 28, n.3, p:187-90, 2011.

REQUENA-MÉNDEZ, A.; DAVIES, G.; ARDREY, A.; JAVE, O.; LÓPEZROMERO, S. L.; WARD, S. A.; MOORE, D. A. L. Pharmacokinetics of rifampin in Peruvian tuberculosis patients with and without comorbid diabetes and HIV. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 2357-63, 2012.

ROY P.D, MAJUMBER M., ROY, B. Pharmacogenomics of anti-TB drug-related hepatotoxicity. **Pharmacogenomics**, v. 9, n.3; p: 311-321, 2008.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**. Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 51-8, 2002.

RUIZ, J D., MARTÍNEZ, C., ANDERSON, K., GROSS, M. *et al.* The Differential Effect of NAT2 Variant Alleles Permits Refinement in Phenotype Inference and Identifies a Very Slow Acetylation Genotype. **PLoS ONE**, v. 7, n.9, 2012.

SABBAGH, A., DARLU, P., CROUAU-ROY, B., POLONI, E. S. Arylamine *N*-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic diversity and traditional subsistence: a worldwide population survey. **PLoS ONE**, v. 6, n.4, 2011.

SAIKI R. K.; GEELFOND D. H.; STOFFEL S.; SCHARF S. J.; HIGUCHI R.; HORN G. T.; MULLIS K. B.; ERLICH H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v. 239, p. 487-91, 1988.

SAUKKONEN, J J., COHN D L., JASMER R M., SCHENKER S., JEREB J A., NOLAN C M., *et al.* “An Official ATS Statement: Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy.” **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 174, n.8, p:935–52., 2006.

SCHABERG, T; REBHAN, K; LODE H. Risk factors for side-effects of isoniazid, rifamoin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 9, n.10, p: 2026-2030, 1996.

SEGOVIA, R.C.M., RAMIREZ, A.M. D., COOK, H.J., AQUINO, M. M., PÉREZ, M. V., BRUNDAGE, R. C., MORENO, S. R. Population pharmacokinetics of rifampicin in Mexican patients with tuberculosis. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**. v. 38, p. 56 – 61, 2013.

SINGLA, N., DHEERAJ G., NITI B. and JAGTAR S. Association of NAT2, GST and CYP2E1 Polymorphisms and Anti-Tuberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity.” **Tuberculosis** v. 94, n.3, p:293–98. 2014.

SINGH, N. DUBEY, S., CHINNARAJ, S., GOLANI, A. e MAITRA, A. Study of NAT2 gene polymorphisms in an Indian population. **Molecular Diagnosis & Therapy**. v .13 p. 49 – 58, 2009.

SHENG, Y. J., WU, G., HE, H., CHEN, W. *et al.* The Association between CYP2E1 Polymorphisms and Hepatotoxicity due to Anti-Tuberculosis Drugs: A Meta-Analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 24, p:34–40, 2014.

SONG, S. H.; JUN, S. H.; PARK, K. U.; YOON, Y.; LEE, J. H.; KIM, J. Q.; SONG, J. Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs and their major metabolic ratios by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 7, p. 1331-8, 2007.

SOTSUKA, T, SASAKI, Y., SHIGEKAZU H., YAMAGUCHI, F. e UENO, K. “Association of Isoniazid-Metabolizing Enzyme Genotypes and Isoniazid-Induced Hepatotoxicity in Tuberculosis Patients.” **In Vivo**, v 25, p:803–12, 2011.

SRIVASTAVA, S., MUSUKA, S., SHERMAN, C., MEEK, C. *et al.* Efflux-pump-derived multiple drug resistance to ethambutol monotherapy in *Mycobacterium tuberculosis* and the pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ethambutol. **The Journal of Infectious Disease**, v. 201, p: 1225-1231, 2010.

STURKENBOOM, MG., AKKERMAN, OW., BOULHUIS, MS. et al. Adequate design of pharmacokinetic-pharmacodynamic studies will help optimize tuberculosis treatment for the future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59: 2474, 2015.

TALBOT, J., MAGNO, L.A.V., SANTANA, C. V.N., SOUSA, S. M.B, *et al.* Interethnic diversity of Nat2 polymorphisms in Brazilian admixed populations. **BioMed Central Genetics**, v.11, n. 87, 2010.

TANEJA, D.P.; KAUR, D. Study on Hepatotoxicity and other side-effects of antituberculosis drugs. **J. India Med. Assoc.** v. 88, n. 10, p. 278-280, 1990.

TEIXEIRA, R.L.F.; MIRANDA, A.B., PACHECO, A.G., LOPES, M. Q.P. et al. Genetic profiles of the arylamine *N*-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. **Mutation Research**, v.624, p: 31-40, 2007.

TEIXEIRA, R.L.F, JUNIOR, F.P.S, SILVEIRA, A. R., CABELLO, P. H. *et al.* Sequence analysis of NAT2 gene in Brazilians: Identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.683, supl. 1-2, p: 43-49, 2010.

TOMALIK-SCHARTE, D., LAZAR, A., FUHR, U, KIRCHEINER, J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. **Pharmacogenomics Journal**. V. 8, n.1, p: 04-15, 2008.

TOSTMANN, A., MTABHO, C.M., SEMVUA, H.H, BOOGARD, J.V.D., et al. Pharmacokinetics of first line drugs in Tanzanian patients. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v 57, n. 7, p. 3208 – 3213, 2013.

UM, S-W., LEE, S. W.; KWON, S. Y.; YOON, H. I.; K. U. PARK.; SONG, J.; LEE, C-T.; LEE, J-H. Low serum concentrations of anti-tuberculosis drugs and determinants of their serum levels. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 11, n. 9, p. 972-8, 2007.

VAN TONGEREN L, NOLAN S, COOK VJ, FITZGERALD JM, JOHNSTON JC. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: a retrospective analysis. **Int J Tuberc Lung Dis** v.17, p:221–224, 2013.

WEINER, M., BURMAN W., VERNON, A., BENATON, D., PELOQUIN, CA., et al. Tuberculosis Trials Consortium. Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once-weekly isoniazid and rifapentine. **American Journal Respiratory Critical Care Med**. V.167, p: 1341- 1347, 2003

WILKINS, J J., LANGDON, G., MCILLERON, H. PILLAI, G. *et al.* Variability in the population pharmacokinetics of pyrazinamide in South African tuberculosis patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, p: 727-735, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report**, 2014. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

YEE D, *et al.* Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. V.167, n.11, p:1472-7, 2003.

YOUNG, B.N., RENDÓN, A., ROSAS-TARACO, A., BACKER, J. *et al.* The effects of socioeconomic status, clinical factors and genetical ancestry on pulmonary tuberculosis disease in northeastern Mexico. **PLoSOne**, v. 9 , n.4, p: 1-8, 2014.

ZANG Y., DOLL MA, ZHAO S., STATES JC., HEIN DW. Characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. **Carcinogenesis**, v. 28, n.8, p: 1665-1671, 2007.

ZHOU, Z., CHEN, L., LIU, P., SHEN, M. e ZOU, F. Simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide, rifampicin e acetilisoniazid in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Analytical Sciences**, v. 26, p:1133 – 1138, 2010.

ZHOU, Z., WU, X., WEI, Q., LIU, Y. *et al.* Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of five first-line antituberculosis drugs in plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p: 6323 – 6335, 2013.

ZHU M, *et al.* Pharmacokinetics of ethambutol in children and adults with tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, p:1360-1367, 2004.

ZUMLA, A I., GILLESPIE, S H., HOELSCHER, M., PHILIPS, P P J. *et al.* New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. **Lancet Infectious Diseases**, v. 14, p: 327-340, 2014.

ZVADA, S P., DENTI, P., DONALD, P R., SCHAAF, H S. *et al.* Population pharmacokinetics of rifampicin, pyrazinamid and isoniazid in children with tuberculosis: *in silico* evaluation of currently recommended doses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p: 1339-1349, 2014.

APÊNDICE 1

QUESTIONÁRIO

Relação entre os fatores genéticos, clínico laboratoriais e sócio demográficos e as concentrações séricas de fármacos utilizados na TB

PCF -

Data da entrevista: ____ / ____ / ____

NOME:

DATA DE NASCIMENTO: ____ / ____ / ____

IDADE:

PESO:

ALTURA:

COMPRIMIDOS/DIA:

DOSE DOS FÁRMACOS:

ENDEREÇO 1:

TELEFONE:

BAIRRO:

CIDADE:

UF:

ENDEREÇO 2:

TELEFONE:

BAIRRO:

CIDADE:

UF:

CARACTERIZAÇÃO SÓCIO DEMOGRÁFICA

1.1 Qual sexo do entrevistado?

- (0) Masculino
- (1) Feminino

1.2 Estado Civil:

- (1) Solteiro
- (2) Casado/Companheiro
- (3) Viúvo
- (4) Desquitado

1.4 Mora em:

- (1) Casa
- (2) Apartamento
- (3) Outro: _____

1.5 O imóvel onde mora é:

- (1) Próprio
- (2) Outro: _____

1.7 Sabe ler e escrever?

- (0) Não
- (1) Sim

1.8 Cor da pele:

- (1) Negro
- (2) Branco
- (3) Pardo
- (4) Asiático

1.3 Mora com alguém?

- (1) Sozinho
 (2) Marido/esposa
 (3) Outros: _____

1.9 Estudou até que série?

- (1) Analfabeto/Fundamental 1 incompleto
 (2) Fundam. 1 compl./Fundam. 2 incompleto
 (3) Fundam.2 compl./Médio incompleto
 (4) Médio completo/Superior Incompleto
 (5) Superior completo ou mais

1.10 Você é o chefe da casa?

- (0) Não (1) Sim

1.11 Série estudou do chefe da casa?

- (1) Analfabeto/Fundamental 1 incompleto
 (2) Fundam. 1 compl./Fundam. 2 incompleto
 (3) Fundam.2 compl./Médio incompleto
 (4) Médio completo/Superior Incompleto
 (5) Superior completo ou mais

1.12 Na sua casa tem:

	Não	Sim	Quantos?
1. Televisão	()	()
2. Rádio	()	()
3. Banheiro	()	()
4. Automóvel	()	()
5. Empregada mensalista	()	()
6. Máquina de lavar	()	()
7. Vídeo/DVD	()	()
8. Geladeira	()	()
10. Freezer	()	()

1.6 Quantas pessoas moram com o sr?

(5) Índio

1.15 A família possui outra fonte de renda? (Aluguel, pensão aposentadoria, etc)?

- (0) Não (1) Sim Qual? _____

1.16 Qual o tipo de casa?

- (1) Tijolo
 (2) Madeira
 (3) Madeira e Tijolo
 (4) Madeira e papelão
 (5) Papelão
 (6) Outra:

1.17 Tem água encanada na sua casa?

- (0) Não
 (1) Sim

1.18 De onde vem a água pra beber?

- (1) Rede pública
 (2) Poço/Cacimba
 (3) Rio, lagoa, açude

1.19 Como é a privada da casa?

- (0) Não tem
 (1) Sanitário com descarga
 (2) Sanitário sem descarga
 (3) Outra:

1.13 Você possui trabalho remunerado?

(1) Sim (0) Não

1.14 Quanto foi a renda familiar (juntando os salários)?

SAÚDE E MEDICAMENTOS**1.20 Você já teve ou tem essas doenças? Se SIM, marcar X.**

Hipertensão	<input type="checkbox"/>	Insuficiência renal crônica	<input type="checkbox"/>
Diabetes	<input type="checkbox"/>	Hepatites virais (B/ C)	<input type="checkbox"/>
Anemia	<input type="checkbox"/>	Cirurgia	<input type="checkbox"/>
Aids	<input type="checkbox"/>	Transtornos mentais	<input type="checkbox"/>
Diarreia	<input type="checkbox"/>	Neoplasia	<input type="checkbox"/>
Transplantado	<input type="checkbox"/>	Doenças digestivas	<input type="checkbox"/>
Hanseníase	<input type="checkbox"/>	Doença crônica pulmonar	<input type="checkbox"/>

1.21 Usou algum medicamento na última semana?

(0) Não (1) Sim

1.22 Toma algum remédio por conta própria?

(0) Não (1) Sim

1.23 Já tomou alguma vez medicamento por conta própria?

(0) Não (1) Sim

1.24 Alguém lhe explicou o motivo do uso do DFC?

(0) Não (1) Sim Quem?

1.25 Explicaram por quanto tempo o sr vai usar?

(0) Não (1) Sim

USO DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS**1.27 Você fuma?**

(0) Não (1) Sim

1.28 Se fuma, quantos cigarros por dia? _____**1.29 Já fumou alguma vez?**

(0) Não (1) Sim

1.30 Você bebe bebida alcoólica?

(0) Não (1) Sim

1.31 Já bebeu alguma vez bebida alcoólica? (1) Sim (0) Não

Qual? _____

1.32 Já usou ou usa alguma dessas substâncias?

a. Maconha (0) Não (1) Sim

b. Cocaína (0) Não (1) Sim

c. Crack (0) Não (1) Sim

d. Heroína (0) Não (1) Sim

e. Outra _____

1.26 Foi explicado sobre dose e tempo entre doses?

(0) Não (1) Sim

HISTÓRICO FAMILIAR

1.33 Houve algum outro caso de TB na sua família?

(0) Não (1) Sim

1.35 Alguém da sua família morreu de TB?

(0) Não (1) Sim

1.34 Se sim, quantos? _____

1.36 Este é o 1º tratamento de TB que o sr faz ?

(0) Não (1) Sim

1.37 Lista de medicamentos em uso

Nº	Nome do medicamento	DCB	Forma farmacêutica	Posologia	Receita?

APÊNDICE 2

Protocolo de encaminhamento de amostra de sangue para monitoramento terapêutica de fármacos (MTF)

1. Antes da coleta fazer a assepsia das mãos e do local, além de identificar os tubos para coleta;
2. Deverão ser coletados 10 mL de sangue do paciente, aproximadamente, utilizando-se:
 - a. 02 tubos de coleta sem anticoagulantes (VERMELHO)
 - b. 01 tubo de coleta com EDTA (ROXO)
3. Todos os tubos de coleta vermelho devem ficar em repouso por 10 minutos, centrifugar e separar o soro, logo em seguida
4. Homogeneizar de 08 a 10 vezes o tubo com EDTA (ROXO)
5. Centrifugar os tubos vermelhos por 15 minutos a 3000 RPM
6. Transferir um dos tubos VERMELHOS com soro para um microtubo identificado com o nome do paciente e data da coleta;
7. Acondicionar as amostras de soro em caixa térmica com gelo e encaminhar ao -70°C e Laboratório de Análises Clínicas (HUGV).
8. O procedimento deve ocorrer em até 4 horas após coleta.

APÊNDICE 3

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS			
DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS			
Controle interno	PCF -	Sexo	M () F ()
Iniciais do nome		Peso (Kg)	
Idade (anos)		Altura (cm)	
Índice de massa corporal		Dose dos fármacos (mg/Kg)	
BAAR	S () N ()	Tempo de tratamento em dias	
PCR	S () N ()	Etilismo	S () N ()
HIV positivo	S () N ()	Diabetes	S () N ()
DADOS LABORATORIAIS			
Parâmetro			Resultado
Albumina			
Aspartato transaminase			
Alanina transaminase			
Bilirrubina total			
Bilirrubina direta			
Bilirrubina indireta			
CONCENTRAÇÃO DOS FÁRMACOS			

Fármaco	Concentração (µg/mL)
Isoniazida	
Rifampicina	
Etambutol	
Pirazinamida	
GENOTIPAGEM DAS PROTEÍNAS-CHAVE	
Gene	Resultado
NAT2	

APÊNDICE 4



PESQUISA: RELAÇÃO ENTRE OS FATORES GENÉTICOS,
CLÍNICO-LABORATORIAIS E SÓCIO DEMOGRÁFICOS E AS
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FÁRMACOS UTILIZADOS NO
TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

CARTÃO DE ACOMPANHAMENTO FARMACÊUTICO

Nome do paciente:

No. Prontuário:

Data de início de tratamento: ____/____/____

Código da pesquisa: **PCDF-**

RETORNO PREVISTO PARA:

____/____/____

APÊNDICE 5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Relação entre os fatores genéticos, clínico-laboratoriais e sócio demográficos e as concentrações séricas de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose”

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: Os pacientes com tuberculose precisam tomar remédios para ficarem curados da doença. Considerando que algumas pessoas têm menores quantidades destes remédios no sangue, o objetivo desta pesquisa é descobrir o que pode influenciar na concentração destes remédios no sangue. Esta pesquisa tem a finalidade de entender quais fatores modificam a quantidade de cada remédio no seu sangue e conseqüentemente o resultado do seu tratamento. Serão coletados 10 ml de sangue (uma única vez, a menos que ocorra algum problema com o processamento da amostra que exija uma nova coleta). A amostra de sangue será processada e analisada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, onde será armazenada durante o prazo de execução do estudo sob a guarda do pesquisador responsável. Você será informado caso a sua amostra seja destruída ou transferida para outro local, caso necessário.

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Caso concorde em participar, o seu tratamento não será mudado em nada, só será acrescentada uma coleta de sangue duas horas após você ter tomado o remédio com duas semanas de tratamento. O desconforto será pela picada que o senhor (a) terá uma vez somente. Ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre o

tema em questão, de forma a contribuir na busca de melhorias do serviço prestado.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à inteira disposição dos participantes para sanar quaisquer dúvidas relacionadas ao estudo em questão. Caso o resultado da sua amostra indique alguma modificação no seu tratamento, a equipe médica será informada. As coletas de sangue serão realizadas somente por pessoal especializado.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Os pesquisadores vão responder qualquer dúvida que você tiver e ajudar você em qualquer problema que possa ocorrer durante o estudo. Seu nome será mantido totalmente em segredo.

Se você não quiser participar, o seu tratamento não será prejudicado de forma alguma. Você tem liberdade de escolher não participar. Você pode desistir de participar em qualquer momento. A sua desistência também não irá prejudicar ou interferir no seu tratamento.

Da mesma forma, você poderá, a qualquer momento e sem nenhum prejuízo, solicitar a retirada da sua amostra cedida para este estudo.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE: Eu, _____ fui

informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que, em qualquer momento, poderei solicitar novas informações, os resultados obtidos com a minha amostra e as orientações quanto às implicações destes resultados. O(s) pesquisador(es) responsável(is) assegurou(aram)-me que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas, poderei chamar o pesquisador responsável Prof. Igor Rafael dos Santos Magalhães, telefone (92) 3305 5000, endereço Rua Alexandre Amorim, 330 – Aparecida e email imagalhaes@ufam.edu.br.

Declaro que concordo em participar deste estudo.

Recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido redigido conforme a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011.

ANEXO 1

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação entre os fatores genéticos, clínico-laboratoriais e sócio-demográficos e as concentrações séricas de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose

Pesquisador: IGOR RAFAEL DOS SANTOS MAGALHÃES

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 19286413.3.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 692.725

Data da Relatoria: 17/06/2014

Apresentação do Projeto:

Em virtude da problemática da tuberculose na região Amazônica, várias ações coordenadas são necessárias para a diminuição dos elevados índices da doença. Neste contexto, diversos pesquisadores têm buscado entender os determinantes das baixas concentrações séricas dos fármacos antituberculose mesmo em pacientes submetidos ao tratamento supervisionado, o que pode comprometer a terapia. No entanto, foi detectada uma lacuna deste tipo de pesquisa na região Amazônica durante a realização do levantamento bibliográfico deste projeto, o que justifica a realização do estudo com o intuito de contribuir para o correto entendimento das falhas terapêuticas verificadas nesta região. Desta forma, o objetivo deste projeto será relacionar as variáveis sócio-demográficas, clínicas e laboratoriais e a ocorrência de polimorfismos de enzimas-chave na farmacocinética com as concentrações séricas de agentes anti-tuberculose em amostras de pacientes atendidos em uma unidade de referência em Manaus. Para tanto, as informações sócio-demográficas e clínicas pacientes serão obtidas dos prontuários dos pacientes disponíveis na unidade de saúde.

Adicionalmente, serão realizadas análises bioquímicas e moleculares e a determinação da concentração sérica dos agentes anti-tuberculose após coleta de sangue única. Os resultados obtidos serão tabulados e posteriormente analisados através de procedimentos estatísticos para a

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

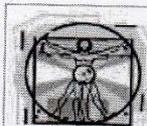
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 692.725

verificação de associação entre as variáveis do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Relacionar as variáveis sócio-demográficas, clínicas e laboratoriais e a ocorrência de polimorfismos de enzimas-chave na farmacocinética com as concentrações séricas de agentes anti-tuberculose em amostras de pacientes atendidos em uma unidade de referência em Manaus.

Objetivo Secundário:

Caracterizar o perfil sócio-demográfico, clínico e laboratorial dos pacientes diagnosticados nesta unidade de saúde; Descrever as frequências de polimorfismos genéticos de proteínas-chave na disposição cinética de fármacos nestes pacientes; Determinar as concentrações séricas de fármacos anti-tuberculose nas amostras destes pacientes; Investigar a associação entre as variáveis sócio-demográficas, clínicas e laboratoriais e os polimorfismos genéticos encontrados e as concentrações séricas dos fármacos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

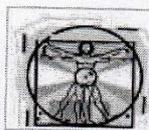
Riscos:

Os principais riscos aos pacientes e pesquisadores estão relacionados ao procedimento de coleta de sangue que, embora realizada por um profissional treinado e com a utilização de material descartável e estéril, poderá ocorrer leve dor e hematoma no local de introdução da agulha.

Benefícios:

Considerando a necessidade da realização de estudos para o correta avaliação dos fatores determinantes para o alcance de níveis séricos considerados satisfatórios dos fármacos anti-tuberculose, o presente estudo visa contribuir para obtenção de dados importantes para o melhor entendimento do tema em questão. Outrossim, acredita-se que os resultados advindos da pesquisa servirão também para auxiliar a equipe clínica no ajuste de dose dos pacientes que apresentarem níveis séricos considerados insatisfatórios conforme a literatura existente. Adicionalmente, o projeto também poderá servir como ensaio-piloto para a implementação de um laboratório de monitorização terapêutica de fármacos anti-tuberculose na região Amazônica, da mesma forma de outros existentes em determinados países da América do Norte e Europa (PELOQUIN, 2002; MAGIS-ESCURRA et al., 2012), o qual poderá atuar de forma decisiva no alcance do sucesso terapêutico de determinados casos, por exemplo, pacientes

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 692.725

portadores de co-morbidades

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Coleta dos dados dos pacientes As informações sócio-demográficas e clínicas pacientes serão obtidas dos prontuários dos pacientes disponíveis na unidade de saúde e os dados serão dispostos em um formulário especialmente desenvolvido para esta finalidade. O instrumento de coleta de dados elaborado consiste em um formulário estruturado que aborda os dados sócio-demográficos, clínico-laboratoriais e genéticos, o qual será preenchido

exclusivamente pelo pesquisador. Posteriormente, as informações coletadas serão tabuladas em uma planilha do programa Microsoft Excel, após o processo de dupla checagem para a garantia da confiabilidade dos resultados. Coleta das amostras de sangue As amostras de sangue no volume total de dez mililitros (10 mL) serão coletadas por profissional habilitado, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(TCLE). Para a determinação dos níveis séricos dos fármacos, os medicamentos anti-tuberculose serão administrados com 150 mL de água aos pacientes selecionados após jejum de oito horas. A coleta de sangue (5 mL) será realizada duas horas após a administração para estimar o pico plasmático dos fármacos e dos dois principais metabólitos. A amostra será imediatamente centrifugada e o soro obtido será armazenado a -70 oC até a análise (UM et al., 2007). Deve-se salientar que a amostra de soro servirá também para as análises bioquímicas. Para as análises moleculares, cinco mililitros de sangue venoso em EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico), na concentração de 1,5 mg/mL \pm 0,25, serão coletados a vácuo. A amostra será encaminhado para Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas as análises bioquímicas além de separação e congelamento para futura extração de DNA de acordo com o protocolo do fabricante do kit (QIAGEN) e futuras análises moleculares. As amostras biológicas serão armazenadas durante o prazo de execução do estudo sob a guarda do pesquisador responsável e o participante será informado caso a amostra seja destruída ou transferida, conforme descrito na Resolução CNS no 441/2011. Determinação das concentrações séricas dos fármacos nas amostras dos pacientes A análise das amostras de soro dos pacientes será efetuada através de um método previamente validado para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. A técnica empregada será a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), a qual requer menor processamento das amostras, possibilitando análise de diversas amostras clínicas (SONG et al., 2007). Análises bioquímicas Os parâmetros bioquímicos dos

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

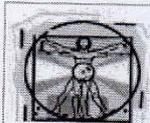
UF: AM

Município: MANAUS

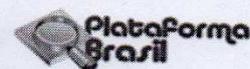
Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 692.725

pacientes, a saber, albumina, bilirrubina e aspartato transaminase e alanina transaminase serão determinados através de métodos enzimáticos padronizados, com o emprego de analisadores automatizados. Análises moleculares O DNA genômico será isolado de leucócitos a partir de 200 μ L de sangue, utilizando-se o método direto QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. O DNA será armazenado a -20 °C até o momento das análises. A análise do polimorfismo genético GSTT1/GSTM1 será determinada através da reação da polimerase em cadeia multiplex (PCR Multiplex) (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). Além disso, os polimorfismos para SLCO1B1 463C, 521T e RS4149032; CYP2E1 (*1, *5 e *6) e NAT2 (*4, *5, *6 e *7) serão realizados pela técnica de PCR em tempo Real com sondas específicas para cada polimorfismo customizados juntos a empresa Applied Biosystems (PAN et al., 200; HIRATSUKA M, 2002; HAMDY et al., 2003). Gene Polimorfismo Efeito Método de detecção CYP2E1 *1, *5 e *6 Alteração da expressão PCR em Tempo Real NAT2 *4, *5, *6 e *7 Alteração da expressão PCR em Tempo Real GSTT1 Deleção Ausência de atividade Multiplex PCR GSTM1 Deleção Ausência de atividade Multiplex PCR SLCO1B1 rs4149032 Atividade e Toxicidade PCR em Tempo Real SLCO1B1 463C e 521T Atividade e Toxicidade PCR em Tempo Real.

Critério de Inclusão:

Pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar BAAR positivo, maiores de 18 anos, que utilizarem os medicamentos antituberculose por, pelo menos, duas semanas antes da coleta das amostras e que aceitarem participar do estudo de forma voluntária.

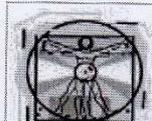
Critério de Exclusão:

Não isolamento de M. tuberculosis, isolamento de micobactérias não tuberculose e pacientes diagnosticados com doenças gastrointestinais e com disfunção renal e/ou hepática.

Metodologia de Análise de Dados:

Os resultados serão apresentados de maneira descritiva através da utilização de tabelas e gráficos. Será aplicada análise univariada para descrição da amostra, para variáveis contínuas serão avaliadas medidas de tendência central e as respectivas medidas de dispersão; para variáveis categóricas serão apresentadas porcentagens. Os resultados serão testados quanto à normalidade e, dependendo do resultado, testes paramétricos ou não paramétricos serão aplicados para comparação. O nível de significância adotado para todas as análises será de 5% (p 0,05%). As

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis **CEP:** 69.057-070
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 **Fax:** (92)3305-5130 **E-mail:** cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 692.725

análises estatísticas serão realizadas utilizando o programa R.

Cronograma de Execução

Coleta dos dados e das amostras 03/03/2014 a 27/02/2015

Padronização das técnicas 01/07/2014 a 31/10/2014

Análises bioquímicas das amostras 01/07/2014 a 27/02/2015

Determinação das concentrações séricas dos fármacos 03/11/2014 30/06/2015

Análises moleculares das amostras 03/11/2014 30/06/2015

Análise estatística dos resultados 01/07/2015 31/12/2015

Redação e divulgação dos resultados 01/01/2016 29/02/2016

Revisão bibliográfica 03/03/2014 29/02/2016

Obtenção dos materiais, reagentes e equipamentos necessários para a pesquisa 03/03/2014 30/06/2014

Orçamento Financeiro Total em R\$ 120.000,00

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto em tela é um PPS e que tem todas as características de um projeto de pesquisa: Introdução, Objetivos, Metodologia, Custos, Cronograma de Execução.

Folha de Rosto - Contemplado

TCLE - Contemplado

Termo de Anuência - Contemplado

Recomendações:

Não se Aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto em tela é uma correção porque foi enviado para o CONEP que devolveu para o CEP informando da sua competência. Diante do exposto somos de parecer pela Aprovação.SMJ.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

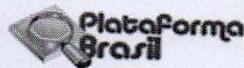
Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 692.725

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 20 de Junho de 2014

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br