



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *TNF* EM  
PACIENTES COM HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR  
MEDICAÇÕES ANTITUBERCULOSAS NO NORTE DO BRASIL.

Sônia Elenita Lopes Valente

Belém  
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *TNF* EM  
PACIENTES COM HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR  
MEDICAÇÕES ANTITUBERCULOSAS NO NORTE DO BRASIL.

Autor: Sônia Elenita Lopes Valente

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Albuquerque  
Sortica

Co-orientador: Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro  
dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Belém  
2015

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB/UFGPA)**

---

Valente, Sônia Elenita Lopes, 1969-

Investigação de polimorfismos no Gene *TNF* em pacientes com hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas no norte do Brasil / Sônia Elenita Lopes Valente; Orientador, Prof. Dr. Vinicius de Albuquerque Sortica. — 2015.

61 f. : il. ; color. : 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Programa de Pós Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2015.

1. Tuberculose. 2. Polimorfismo Genético. 3. Farmacogenética. I. Sortica, Vinicius de Albuquerque, *orient.* II. Título.

CDD - 23. ed. 616.99509815

---

A Deus por me dar a vida e por permitir que eu esteja  
vivenciando esta experiência.

Aos meus queridos pais, Mário e Ecy, *in memoriam*. A  
eles todo meu amor e eterna gratidão por tudo que  
fizeram por mim ao longo de minha vida. Desejo poder  
ter sido merecedora do esforço dedicado por eles em  
todos os aspectos, especialmente quanto à minha  
formação.

Ao meu esposo Ronaldo e aos meus filhos Caio e  
Samara, por todo amor, carinho, incentivo e  
compreensão nos momentos difíceis.

A toda minha família, em especial aos meus irmãos,  
por serem também grandes amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vinicius de Albuquerque Sortica, pelos seus ensinamentos, sua paciência e por ter me dado a oportunidade de conhecer e desenvolver esse projeto, me fornecendo orientações seguras com toda sua experiência.

Ao Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos pelo acolhimento e por ter me dado a oportunidade de realizar uma pesquisa em farmacogenética, tão distante da minha prática clínica. Agradeço muito a disponibilidade que sempre teve de ajudar e orientar.

À Ana Braga, pela grande ajuda na realização desse trabalho e pela amizade.

À Débora Fernandes pela valiosa colaboração para que esse trabalho tenha se realizado.

Agradeço ao técnico de laboratório do NPO, Antônio Modesto, pela contribuição na realização desse trabalho.

À Terezinha De Bastiani, pela sua disponibilidade em ajudar, por ter colaborado na coleta das amostras, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis.

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

## RESUMO

A tuberculose persiste como um grave problema de saúde pública em todo o mundo. A hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas provoca um grande número de hospitalizações, podendo ser fatal se o tratamento não for interrompido. Os mecanismos da hepatite induzida pelas medicações antituberculosas ainda não foram esclarecidos e estudos sugerem que mecanismos imunológicos estão envolvidos na sua patogênese. A citocina TNF- $\alpha$  é um dos principais mediadores inflamatórios do sistema imunológico e variações em seus níveis parecem estar relacionadas à patogênese da hepatite induzida por fármacos. Diferenças observadas nos níveis dessa citocina podem estar relacionadas com polimorfismos no gene *TNF*. O conhecimento de polimorfismos no gene *TNF* envolvidos no desenvolvimento de hepatotoxicidade por medicações antituberculosas permitirá a utilização desses marcadores moleculares para melhorar o manejo terapêutico nesses pacientes. O presente estudo investigou a influência dos polimorfismos -308C>T (rs1800629), -1031C>T (rs1799964), -238A>G (rs361525) e -857C>T (rs1799724) do *TNF* no desenvolvimento da hepatotoxicidade. Foram incluídos no estudo 68 pacientes com tuberculose que apresentaram hepatotoxicidade ao esquema básico composto de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (2RHZE/4RH) e 191 pacientes sem efeitos adversos à terapia. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, e forneceram dados clínicos e epidemiológicos e amostras de sangue para perfil genético. Os polimorfismos foram determinados por PCR em tempo real com sondas *TaqMan*. Comparando a frequência dos genótipos entre os casos e controles, identificou-se uma diferença significativa na distribuição dos genótipos do SNP -1031C>T ( $p = 0,003$ ). A frequência dos homozigotos -1031CC foi maior no grupo caso (8,8%) do que no grupo controle (1,6%). Os pacientes homozigotos -1031CC apresentaram um risco aumentado para o desenvolvimento de hepatotoxicidade quando comparados ao homozigotos -1031TT ou aos portadores do alelo T (OR = 8,632,  $p = 0,014$  e OR = 11,355,  $p = 0,004$ ). Concluímos que o SNP -1031C>T do gene *TNF* foi significativamente associado com a susceptibilidade à hepatite induzida por medicações antituberculosas na população do norte do Brasil.

Palavras-chave: Tuberculose, Hepatotoxicidade, Mecanismos imunológicos, Citocina TNF- $\alpha$ , Gene TNF, SNP -1031.

## ABSTRACT

Tuberculosis still remains a serious public health problem worldwide. The hepatotoxicity induced by anti-tuberculosis drugs causes a large number of hospitalizations and may be fatal if treatment is not interrupted. The hepatitis induced by anti-tuberculosis drugs are not yet fully understood and clinical studies suggests that immunological mechanisms are involved in its pathogenesis. The cytokine TNF- $\alpha$  is a major mediator of inflammatory and immune changes in the levels of this cytokine may be related to pathogenesis of drug-induced hepatitis. These changes observed may be related to polymorphisms in the TNF gene. The knowledge of which polymorphisms in the TNF gene are involved in the risk of developing hepatotoxicity anti-tuberculosis drugs will permit the use of these molecular markers to improve the therapeutic management of these patients. This study investigated the influence of polymorphisms -308C>T (rs1800629), -1031C>T (rs1799964), -238A>G (rs361525) and -857C>T (rs1799724) in the TNF gene with drug-induced hepatotoxicity. The study included 68 patients with tuberculosis who had hepatotoxicity of the basic regimen consisting of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol (2RHZE/4R) and 191 patients without adverse therapy effects. The polymorphisms were determined by real-time PCR with TaqMan probes. Comparing the frequency of genotypes between cases and controls, a significant difference in the distribution of genotypes of the SNP -1031C>T was identified ( $p = 0.003$ ). The frequency of homozygous -1031CC was higher in the case group (8.8%) than in the control group (1.6%). The -1031CC homozygous patients had an increased risk for the development of hepatotoxicity when compared to homozygous -1031TT or the T allele carriers (OR = 8.632,  $p = 0.014$ , OR = 11.355,  $p = 0.004$ ). We concluded that -1031C>T SNP was significantly associated with susceptibility to induced hepatitis anti-tuberculosis drugs in the north population of Brazil.

Keywords: Tuberculosis, Liver toxicity, Immunological mechanisms, TNF-  $\alpha$  cytokine, TNF gene, SNP -1031

## LISTA DE SIGLAS

**ALT:** Alanino Aminotransferase.

**APC:** Célula Apresentadora de Antígeno.

**AST:** Aspartato Aminotransferase.

**AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

**BCG:** *Bacille* Calmette-Guérin.

**EB:** Esquema Básico.

**Et:** Etionamida.

**E:** Etambutol.

**FADD:** Proteína de Domínio de Morte associada a Fas.

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana.

**H:** Isoniazida.

**HLA:** Antígeno de Leucócitos Humanos.

**HWE:** Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**IC:** Intervalo de Confiança.

**IAM:** Marcador Informativo de Ancestralidade.

**ILTB:** Tuberculose Latente.

**KC:** Célula de *Kupffer*.

**Kb:** Kilobase.

**KDa:** Kilodalton.

**MHC:** Complexo Maior de Histocompatibilidade.

**MS:** Ministério da Saúde.

**NAT2:** N-Acetiltransferase 2.

**NK:** Natural *Killer*.

**NKT:** Natural *Killer* T.

**NF- $\kappa$ B**: Fator Nuclear Kappa B.

**OMS / WHO**: Organização Mundial da Saúde.

**PAS**: Ácido Para Amino Salicílico.

**PCR**: Reação em Cadeia da Polimerase.

**PNCT**: Programa Nacional Controle Tuberculose.

**RAM**: Reação Adversa Medicamento.

**RIPK1**: Proteína 1 de interação com o receptor.

**R**: Rifampicina.

**S**: Estreptomicina.

**SNP**: Polimorfismo de Base Única.

**TACE**: Enzima de Conversão TNF- $\alpha$ .

**TCAR**: Tomografia Computadorizada de Alta Resolução.

**TCR**: Receptor de Célula T.

**TNF**: Fator de Necrose Tumoral.

**TNF- $\alpha$** : Fator de Necrose Tumoral alfa

**TNFR**: Receptor de TNF.

**TNFR1**: Receptor 1 de TNF.

**TRADD**: Proteína de Domínio de Morte associada ao TNFR1.

**TRAF2**: Fator de TNF2 associada ao receptor.

**TRM-TB**: Teste Rápido Molecular para tuberculose.

**TCLE**: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Z**: Pirazinamida.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Taxas de incidência mundial de tuberculose, em 2013 .....	16
FIGURA 2 Mecanismos da lesão hepática por fármacos .....	24
FIGURA 3 Subconjuntos funcionais efetores de células TCD4+ .....	26
FIGURA 4 Vias de sinalização do <i>TNF</i> .....	28
FIGURA 5 Vias de sinalização dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1 .....	29
FIGURA 6 Localização do gene <i>TNF</i> no cromossomo 6 .....	29
FIGURA 7 Localização do gene <i>TNF</i> no MHC .....	30
FIGURA 8 Gráfico triangular das proporções de ancestralidade genômica ameríndia, europeia e africana dos pacientes com tuberculose.....	40
FIGURA 9 Estrutura do desequilíbrio de ligação da região promotora do <i>TNF</i> .	41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Coeficientes de incidência, mortalidade e coinfeção por HIV e tuberculose no Brasil por regiões, em 2014 .....	17
TABELA 2 Estudos de farmacogenética avaliando a hepatotoxicidade em diferentes populações .....	22
TABELA 3 Características clínicas e demográficas dos pacientes com tuberculose que apresentaram hepatotoxicidade e sem hepatotoxicidade .....	39
TABELA 4. Médias e variação das proporções genéticas (%) dos grupos de pacientes com tuberculose que apresentaram ou não a hepatite medicamentosa .....	41
TABELA 5 Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de <i>TNF</i> em pacientes com e sem hepatotoxicidade .....	42
TABELA 6 Análise de regressão logística entre os genótipos de referência e os genótipos de risco do <i>TNF</i> para o desenvolvimento de hepatite induzida por medicações antituberculosas .....	43

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 TUBERCULOSE	14
1.1.1 Epidemiologia	15
1.1.2 Formas clínicas	17
1.1.3 Diagnóstico	18
1.1.4 Tratamento	19
1.1.4.1 Efeitos adversos aos fármacos antituberculose	20
1.2 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS NA HEPATITE MEDICAMENTOSA	22
1.3 FATOR DE NECROSE TUMORAL $\alpha$	26
1.3.1 Gene <i>TNF</i>	29
1.3.2 Polimorfismos no gene <i>TNF</i>	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVO	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 APLICABILIDADE	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA	37
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA	38
5.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS	38
5.4 MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE	38
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6 RESULTADOS	40
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	40
6.2 ESTRUTURA DA POPULAÇÃO	41
6.3 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO <i>TNF</i>	42
7 DISCUSSÃO	45
8 CONCLUSÃO	48
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

10 ANEXOS	58
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	58
ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO	60

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose ainda hoje persiste como um grave problema de saúde pública em todo o mundo e vem impondo grandes desafios de controle apesar de ter tratamento disponível e eficaz (CAI *et al.*, 2012).

Essa enfermidade aflige a humanidade há milhares de anos tendo seus achados na coluna de esqueletos do período neolítico (7000-3000 a.C) e em múmias do Egito (SIQUEIRA, 2012).

Essa patologia atingiu proporções epidêmicas na Europa e América do Norte durante os séculos XVIII e XIX (DANIEL, 2006). No Continente Americano foram os navegantes espanhóis e portugueses no século XV, ingleses, franceses e holandeses nos séculos XVI e XVII que introduziram e expandiram a doença (MELO *et al.*, 2009). Acredita-se que o bacilo da tuberculose tenha chegado ao Brasil trazido por colonizadores e jesuítas no período logo após o descobrimento (SANT'ANNA, 1985).

A tuberculose é causada por uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis*) que é transmitida por via aérea, através da tosse, espirro ou fala (ROSEMBERG *et al.*, 2008). Um paciente com tuberculose pulmonar e baciloscopia do escarro positiva se não tratado em um ano, pode infectar de 10 a 15 pessoas (SILVA, 2012). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo da tuberculose (PILLER, 2012).

O sistema respiratório é a porta de entrada para o bacilo, causando um foco de infecção no local onde se deposita após ser inalado. Se a infecção não for contida no sítio inicial de infecção, a disseminação do bacilo ocorre através da via hematogênica, provavelmente dentro dos macrófagos, atingindo a pleura e diferentes órgãos. Alcança os linfonodos hilares por via linfática, podendo ocasionar uma segunda disseminação sistêmica, através do ducto torácico e da veia cava superior, com o desenvolvimento de focos nos pulmões. Focos extrapulmonares também podem ser produzidos por disseminação hematogênica e linfática (MELO *et al.*; 2009).

Acredita-se que a aplicação da vacina *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) tenha essencial importância, evitando a disseminação e a ocorrência de formas extrapulmonares da tuberculose (PALOMINO *et al.*; 2007).

Em pacientes com deficiência no sistema imunológico, a infecção inicial ou primo-infecção pode evoluir para doença, sendo chamada de tuberculose primária e ocorre com mais frequência em crianças. Em imunodeprimidos graves, pode evoluir como formas disseminadas, grave e fatal. A doença pós primária pode ocorrer em qualquer fase da vida, e resulta da reativação de foco antigo (reinfecção endógena) ou de contágio recente com paciente em tratamento para tuberculose (reinfecção exógena), sendo chamada de tuberculose de reinfecção ou do adulto (ROSEMBERG *et al.*, 2008).

Nas primeiras décadas do século XX, a mortalidade de pacientes com tuberculose era muito elevada em todo o mundo. Com o advento do tratamento farmacológico, foi possível reduzir consideravelmente a mortalidade por essa patologia (DAVIES e NUERMBERGER, 2008; WIRTH *et al.*, 2008).

Até a década de 80, tinha-se a expectativa da eliminação dessa doença, já considerada sob controle relativo nos países desenvolvidos. A partir de 1981, com o surgimento e a disseminação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) houve uma mudança no perfil epidemiológico dessa doença, resultando no aumento da morbidade e mortalidade em todo o mundo. O crescimento mundial da sua incidência levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1993, a declarar a tuberculose como emergência sanitária mundial, alertando para a necessidade de maiores esforços no seu combate (MS, 2011).

Nos países em desenvolvimento, determinantes sociais urbanos, como pobreza, baixa escolaridade, condições precárias de moradia, marginalização de indivíduos e difícil acesso aos serviços de saúde, tornam as pessoas vulneráveis ao *Mycobacterium tuberculosis*, onde ele circula, contribuindo para perpetuar a doença (PILLER, 2012).

### 1.1.1 Epidemiologia

A OMS estimou que em 2013, ocorreram nove milhões de casos novos de tuberculose, o equivalente a 126 por 100.000 habitantes, com 1,5 milhão de óbitos pela doença (WHO, 2014).

Segundo a OMS, 22 países concentram cerca de 80% dos casos dessa doença. O Brasil faz parte desse grupo, ocupando a 16ª posição em número absoluto de casos (WHO, 2014).

Os países que destacam-se como tendo os piores indicadores epidemiológicos da tuberculose são a Índia, China, Nigéria, Paquistão, Indonésia e África do Sul (WHO, 2014). Esses indicadores incluem: o número total de casos, a taxa de incidência (por 100.000 indivíduos da população), o número de indivíduos afetados por todas as formas de tuberculose, a taxa de prevalência (por 100.000 habitantes) e a mortalidade.

A figura 1 mostra que a incidência da tuberculose, no ano de 2013, variou amplamente entre os países. A maioria do número de casos ocorreu na Ásia (56%) e na região Africana (29%), uma pequena proporção ocorreu no Mediterrâneo Oriental (8%), na região Européia (4%) e na região das Américas (3%) (WHO, 2014).

No Brasil, em 2014, foram diagnosticados 67.966 casos novos de tuberculose, o que equivale ao coeficiente de incidência (CI) de 33,5/100.000 habitantes (MS, 2015). A tabela 1 apresenta os dados numéricos dos coeficientes de incidência, mortalidade de tuberculose e coinfeção por HIV no Brasil, no ano de 2014 (MS, 2015).

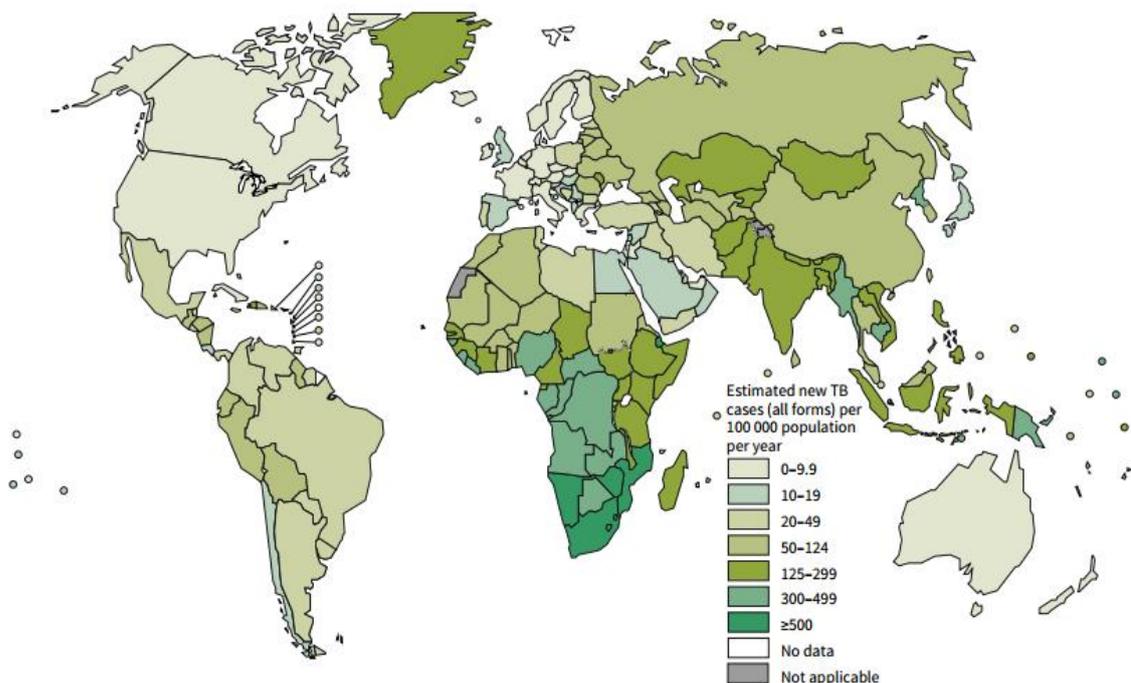


Figura 1 – Taxas de incidência mundial da tuberculose em 2013, Fonte: Global tuberculosis control, report 2014 – WHO.

Tabela 1 – Coeficientes de incidência, mortalidade de tuberculose e coinfeção por HIV no Brasil em 2014, por regiões (Modificado de MS, 2015).

Regiões	Coeficiente de incidência	Coeficiente de mortalidade <sup>a</sup>	Coinfeção TB–HIV (%)
Norte	44,4	2,7	10,8
Nordeste	31,6	2,7	8,5
Centro-Oeste	21,4	1,4	8,3
Sudeste	36,2	2,4	9,4
Sul	29,6	1,4	18,2

Coeficientes por 100 mil habitantes;

Incidência representa o número de casos novos determinados em um período;

<sup>a</sup>Dados referentes ao ano de 2013.

### 1.1.2 Formas Clínicas

A tuberculose pode se desenvolver de forma pulmonar (primária, pós-primária, ou miliar) ou extra pulmonar (MELO *et al.*, 2009).

A tuberculose pulmonar primária ocorre de forma insidiosa, sendo mais comum em crianças. As crianças se apresentam irritadiças, com febre baixa, sudorese noturna, inapetência, entretanto, o exame físico é geralmente inexpressivo (MELO *et al.*, 2009).

A tuberculose pulmonar pós-primária (secundária) é mais comum em adultos, que na maioria das vezes apresentam tosse persistente, produtiva ou não, e eventualmente com escarros hemoptóicos, febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (BETHLEM, 2012).

A tuberculose miliar é uma denominação vinculada ao aspecto radiológico pulmonar, sendo uma forma grave da doença ocorrendo em 1% dos casos em pacientes HIV soronegativos e em até 10% dos casos em pacientes HIV soropositivos em fase avançada de imunossupressão. Clinicamente se observa febre, astenia e emagrecimento que em associação com tosse ocorrem em 80% dos casos. Outras alterações clínicas que podem ser encontradas são hepatomegalia, alterações do sistema nervoso central e alterações cutâneas do tipo eritemato-máculo-papulo-vesiculosas (SIQUEIRA, 2012).

As apresentações extrapulmonares da tuberculose têm seus sinais e sintomas dependentes dos órgãos e/ou sistemas acometidos. Sua ocorrência aumenta entre pacientes com AIDS, especialmente entre aqueles com

imunossupressão grave. As formas mais frequentes de tuberculose extrapulmonar são: pleural, ganglionar, meníngea e osteoarticular (BETHLEM, 2012).

### 1.1.3 Diagnóstico

Diferentes métodos diagnósticos da tuberculose são utilizados atualmente sendo os bacteriológicos e o teste rápido molecular para tuberculose (TRM - TB) os principais (MS, 2015).

O diagnóstico bacteriológico pode ser realizado pela baciloscopia direta e cultura para micobactéria. A baciloscopia ou exame microscópico é a pesquisa do bacilo em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado com metodologia padronizada. O método de coloração de Ziehl Neelsen baseia-se na propriedade de álcool-ácido resistência (coloração de ácidos micólicos presentes na membrana da bactéria por fucsina) e sua utilização é recomendada pelo Ministério da Saúde (MS) para todos os laboratórios que realizam o diagnóstico da tuberculose pulmonar e outras micobactérias, uma vez que possibilita a identificação do bacilo e utiliza o microscópio ótico comum, para leitura do esfregaço (MS, 2008). Apesar dos avanços tecnológicos na micobacteriologia, a baciloscopia, corada pelo método de Ziehl Neelsen e seguindo técnica padronizada de observação ao microscópio de campo claro, mesmo sendo um método de simples execução, continua sendo particularmente importante no combate da tuberculose por ser de baixo custo e por detectar casos bacilíferos, ou seja, casos infecciosos de tuberculose pulmonar, responsáveis pela cadeia de transmissão (MS, 2008).

A cultura é um exame de elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da tuberculose, sendo realizada pelos meios de cultura sólido à base de ovo, como o Lowestein-Jensen e Ogawa-Kudoh, nos quais o tempo de detecção do crescimento bacteriano varia de 14 a 30 dias, podendo se estender por até oito semanas (MS, 2011). A cultura permite a identificação da espécie da micobactéria isolada e a realização do teste de sensibilidade às medicações antituberculosas. Quando realizada no escarro, pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença nos pacientes com baciloscopia negativa, entretanto, o tempo para o resultado é uma importante limitação na sua realização (MS, 2008).

O TRM-TB utiliza técnicas de biologia molecular para identificar o DNA do *Mycobacterium tuberculosis*. A sensibilidade do TRM-TB é de cerca de 90%

(enquanto a da baciloscopia é de 65%), a especificidade é de 99% e o resultado é liberado em duas horas favorecendo o início oportuno do tratamento convencional. Além disso, o TRM-TB também detecta a resistência à rifampicina, um dos principais fármacos usados no tratamento da tuberculose, o que possibilita identificar os casos de resistência às medicações, diminuindo o tempo necessário para o início do tratamento com os fármacos de segunda linha (MS, 2015).

As alterações encontradas no RX de Tórax podem sugerir a presença da doença em atividade e permitem uma estimativa da sua extensão, porém não são patognomônicas de tuberculose, pois outras doenças podem apresentar imagens semelhantes (MELLO, 2012). Da mesma forma, a Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (TCAR) do tórax pode ser indicada para a investigação de pacientes sintomáticos respiratórios com resultados negativos na baciloscopia do escarro. As principais alterações são a presença de nódulos no espaço aéreo ou nódulos acinares, associados a ramificações lineares, configurando o padrão de árvore em brotamento (MELLO, 2012).

Outro teste utilizado é a prova tuberculínica que consiste na inoculação intradérmica de um derivado proteico do *M. tuberculosis* para medir a resposta imunológica celular a estes antígenos. É utilizada em adultos para o diagnóstico de infecção latente da tuberculose (ILTb), sendo que em crianças também é muito importante como método coadjuvante para o diagnóstico da tuberculose doença. Outros métodos são usados para diagnóstico da tuberculose como escarro induzido, broncoscopia, métodos anatomopatológicos e testes sorológicos (MS, 2011).

#### 1.1.4 Tratamento

No final da década de 40, segundo publicação do Conselho Médico Britânico, o tratamento farmacológico da tuberculose foi iniciado com a utilização da estreptomicina (S) em monoterapia. O rápido desenvolvimento de resistência à estreptomicina levou à utilização de novos fármacos como ácido para-aminossalicílico (PAS), isoniazida (H), pirazinamida (Z), tiossemicarbazona, cicloserina, canamicina, etionamida (Et), etambutol (E) e capreomicina. Nos anos 50, surgiu o primeiro regime combinado de medicações composto por estreptomicina, ácido para-aminossalicílico e isoniazida (SPASH) administrados por 24 meses (DALCOMO, 2012).

A busca de regimes terapêuticos mais eficazes, mais curtos e toleráveis, na década de 60, permitiu que o ácido para-aminossalicílico fosse gradualmente substituído pelo etambutol, e o regime tríplice (SHE) foi encurtado para um período de 12 meses. A introdução da Rifampicina (R) na terapia em 1971, possibilitou a redução do tempo do tratamento para seis meses, devido sua ação bactericida tanto na fase inicial de dois meses (fase rápida), como na fase de manutenção (quatro meses seguintes) (DALCOMO, 2012).

No Brasil, em 1979, o sistema terapêutico para tuberculose recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) assim se compôs: Esquema I para pacientes virgens de tratamento, constituído de RHZ nos dois primeiros meses e RH nos quatro meses seguintes (2RHZ/4RH); Esquema I Reforçado (2RHZE/4RH) para pacientes após cura ou abandono; Esquema II (2RHZ/7RH) para meningoencefalite; Esquema III (3SEEtZ/9EEt) para falência dos esquemas anteriores; e Esquemas para casos de multiresistência (DALCOMO, 2012).

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com seu Comitê Técnico Assessor, reviu o sistema de tratamento, realizando alterações como a introdução do quarto fármaco, o etambutol, no início do tratamento, e a utilização de comprimidos com doses fixas combinadas (RHZE), para a fase de tratamento intensivo e RH para a fase de manutenção (MS, 2011).

O Esquema Básico (EB) atualmente indicado para todas as formas de tuberculose pulmonar e extra-pulmonar, exceto a meningoencefálica, bem como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono, tem como apresentação farmacológica, comprimido nas seguintes dosagens: R 150 mg, H 75 mg, Z 400 mg e E 275 mg (MS, 2011).

#### 1.1.4.1 Efeitos adversos aos fármacos antituberculose

A OMS define reação adversa a medicamentos (RAMs) como “resposta a um medicamento que é nociva, não intencional e que ocorre em doses normalmente usadas na medicina para profilaxia, diagnóstico, terapêutica ou para modificação de função fisiológica” (RISSATO *et al.*, 2008).

As RAMs antituberculose podem ser divididas em reações adversas menores e maiores. As reações adversas mais frequentes ao esquema I, utilizado por muitos

anos no Brasil, são: mudança da coloração da urina (ocorre universalmente), intolerância gástrica (40%), alterações cutâneas (20%) e dor articular (4%). Com essas reações adversas não é necessária a suspensão do medicamento, sendo a conduta preconizada em tais situações, a orientação do paciente, a reformulação do horário da administração da medicação e prescrição de sintomáticos (MS, 2011).

As reações adversas maiores normalmente causam suspensão do tratamento e determinam alteração definitiva no esquema terapêutico em 3 a 8% dos casos (MS, 2011).

A terapia antituberculosa com rifampicina, isoniazida e pirazinamida é efetiva, mas essas três medicações podem induzir hepatotoxicidade (SHARMA *et al.*, 2002). A hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas é um quadro grave, que provoca hospitalizações e pode ser fatal se o tratamento não for interrompido (CAI *et al.*, 2012).

O diagnóstico do dano hepático causado por fármacos é baseado em evidências clínicas e laboratoriais. Clinicamente o paciente cursa com dor abdominal, náuseas, vômitos e icterícia (MS, 2011).

Diversos critérios laboratoriais para definir hepatotoxicidade induzida por fármacos estão descritos na literatura. A *British Thoracic Society* sugere que quando houver um aumento de Alanina aminotransferase (ALT), acima de duas vezes os valores de referência, a medicação deverá ser retirada e reintroduzida quando os parâmetros voltarem ao normal. A *American Thoracic Society* orienta a suspensão da medicação quando os níveis de transaminases atingirem níveis iguais ou superiores a três vezes o limite superior de referência para pacientes com sintomas sugestivos de hepatotoxicidade como icterícia, anorexia, náuseas, vômitos ou dor abdominal (POSSUELO, 2008).

No Manual de Recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, existe a indicação que o tratamento deve ser interrompido quando os valores das enzimas atingirem três vezes o valor normal, com início de sintomas, ou logo que a icterícia se manifeste. Após a melhora dos sintomas e redução dos valores das enzimas hepáticas, as medicações devem ser introduzidas isoladamente com a avaliação da função hepática, considerando a continuidade do esquema básico ou esquema alternativo para hepatotoxicidade conforme cada caso (MS, 2011).

Diferentes estudos demonstram a hepatotoxicidade induzida pelas medicações antituberculosas (Tabela 2). A identificação de pacientes em risco

aumentado de desenvolver hepatotoxicidade possui grande importância uma vez que essa reação adversa causa significativa morbidade e mortalidade (SHARMA *et al*, 2002).

Tabela 2 Estudos de farmacogenética avaliando a hepatotoxicidade em diferentes populações

País	Número de pacientes	Esquema Terapêutico	Incidência de hepatotoxicidade	Critério de hepatotoxicidade	Referência
China	318	RHZE	15,4%	ALT>2X ULN	HUANG <i>et al.</i> ; 2003
Espanha	471	RHZ	11,9%	AST/ALT> 3X ULN	FERNÁNDEZ-VILLAR <i>et al.</i> ; 2004
Coréia	132	RHZE	13,6%	ALT> 2X USN	CHO <i>et al</i> , 2007
Tanzânia	112	RHZE	0,9%	ALT> 3X ULN + sintomas	TOSTMANN <i>et al.</i> ; 2010
Brasil	270	RHZ	6,7%	ALT> 3X ULN	SANTOS <i>et al</i> , 2013
Brasil	220	RHZ	14,1%	ALT> 3X ULN	FERNANDES <i>et al.</i> ; 2014

RHZE: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Etambutol; RHZ: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida.

## 1.2 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS NA HEPATITE MEDICAMENTOSA

Dois mecanismos têm sido propostos no desencadeamento da hepatite medicamentosa. O primeiro envolve a hepatotoxicidade intrínseca de determinada medicação ou mais frequentemente como resultado dos efeitos tóxicos de metabólitos da mesma no fígado. O segundo mecanismo inclui fatores não relacionados ao metabolismo das medicações e reflete uma reação imunológica, na maioria das vezes, de natureza idiossincrásica, ou seja, imprevisível e dependente do indivíduo. Em adição, ambos os processos alérgicos e não alérgicos têm sido implicados no mecanismo de hepatite medicamentosa (MASSON *et al.*; 2010, HOLT; JU, 2010).

Em alguns tipos de hepatite medicamentosa a lesão hepática pode ser potencializada por uma resposta inflamatória, na qual citocinas modulam a inflamação. As citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por

células T, macrófagos, células dendríticas e estão intimamente relacionadas ao processo inflamatório. Sua produção é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. Elas atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imunológica e inflamatória, sendo que atualmente já foram descritas mais de 200 diferentes citocinas, pertencentes às famílias hematopoiéticas, interferons, quimiocinas e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (MASSON *et al.*; 2010).

As citocinas se ligam a seus receptores específicos expressos na superfície da célula alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula. A maioria dos receptores de citocinas é composta de subunidades distintas: uma cadeia alfa envolvida na ligação à citocina e na transdução de sinais e outra cadeia beta envolvida na cascata de sinalização (MASSON *et al.*; 2010).

Nas RAMs, as citocinas atuam devido as suas habilidades para regular ambas as respostas imunológicas inata e adaptativa. O papel das citocinas no fígado para determinar susceptibilidade às RAMs tem sido bastante explorado. Em resposta a uma lesão, o fígado produz tanto citocinas que podem causar danos aos hepatócitos ou citocinas que promovem um efeito protetor, e se acredita que o balanço entre essas citocinas, afeta a predisposição individual para desenvolvimento de toxicidade por fármacos. Nessa hipótese, ocorre um desequilíbrio nas citocinas o que promove uma resposta imunológica nociva aumentando o risco de danos ao fígado, induzidos por fármacos (MASSON *et al.*; 2010).

O dano no hepatócito pode resultar na liberação de sinais que estimulam a ativação de células do sistema imunológico inato, incluindo células de *Kupffer* (KC), células *Natural Killer* (NK) e as células *Natural Killer T* (NKT), que atuam como primeira linha de defesa contra patógenos e células tumorais, antes da resposta imunológica adaptativa. Na resposta imunológica inata, as células NK e NKT contribuem para a progressão da lesão do fígado através da produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que pode induzir diretamente o dano hepático, a interleucina-12 e a interleucina-18, que são importantes ativadores de células NK e células NKT (HOLT; JU, 2006) (Figura 2).

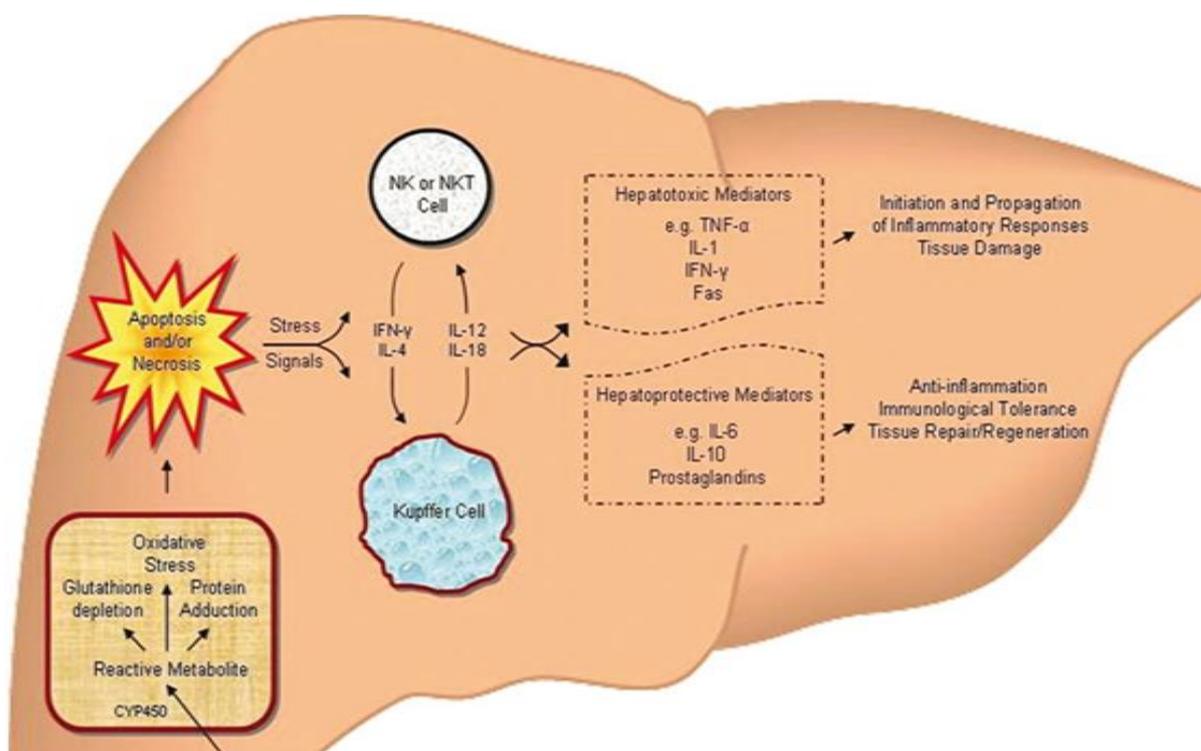


Figura 2 – Mecanismos da lesão hepática por fármacos Fonte: HOLT; JU, 2006

Na hepatite medicamentosa provocada por algumas medicações são observadas manifestações clínicas que são indicativas de reações de hipersensibilidade que usualmente ocorrem no período de uma a quatro semanas após o início do tratamento medicamentoso, tais como rash cutâneo, febre e eosinofilia. Achados, tais como anticorpos contra medicações, presença de células T reativas e menor tempo de início da hepatotoxicidade após readministração da medicação, também são observados nessa reação (HOLT; JU, 2010; MASSON *et al.*; 2010). Esse tipo de hepatotoxicidade é frequentemente referida como uma “hepatite alérgica” devido a indução da resposta imunológica adaptativa pelas medicações. Nesse tipo de hepatite, um grau pequeno de lesão hepática é necessário para iniciar uma resposta imunológica específica à medicação (MASSON *et al.*; 2010).

A resposta imunológica adaptativa depende da ativação dos linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas (anticorpos, citocinas, quimiocinas) (CRUVINEL *et al.*, 2010). Para serem imunogênicas e serem reconhecidas pelas células T, as medicações devem ser quimicamente reativas (haptenos) ou serem metabolizadas para formar compostos reativos (pró-haptenos). A reação

imunológica se inicia com a estimulação das células do sistema imunológico inato através de ligação covalente a receptores específicos de reconhecimento. Esse complexo de proteína hapteno-transportador atua como um antígeno que pode ser processado e apresentado a células T e pode ser limitado por ambas as células T e B, provocando uma resposta humoral ou celular mediada por resposta imunológica (HOLT; JU, 2010, DE LA TORRE; SUH OH, 2013).

Esse mecanismo hapteno não explica o porquê de algumas medicações desencadearem reações de hipersensibilidade apesar de serem incapazes de submeter-se a conjugação e transformação em antígenos. Esta capacidade de não requerer sensibilização prévia, tem sido explicada pela formulação de uma nova hipótese imunológica de resposta, o conceito p-i. (HOLT; JU, 2010, DE LA TORRE; SUH OH, 2013). O conceito p-i postula que as medicações são diretamente capazes de estimular as células T através da interação com receptores de células T nas células apresentadoras de antígenos (APCs) sem a necessidade de formação de hapteno-proteína (HOLT; JU, 2010, HASHIZUME, 2012; DE LA TORRE; SUH OH, 2013). De acordo com este conceito, algumas medicações podem se ligar diretamente a receptores imunológicos específicos e desencadear uma resposta imunológica mesmo quando administradas pela primeira vez (DE LA TORRE; SUH OH, 2013). Foi demonstrado que a alta afinidade das medicações com o Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) expresso nas APCs ou com receptores de células T (TCRs) expressos nas células T, aumenta a possibilidade de ativação das células T (DE LA TORRE; SUH OH, 2013).

As células T são divididas em subtipos CD4+ e CD8+ e as primeiras podem ser classificadas em Th0, Th1, Th2, Th9, Th17 e Th22, dependendo do perfil de citocinas liberadas por elas (HASHIZUME, 2012) (Figura 3). As citocinas podem desempenhar um papel importante na hepatite alérgica através da resposta imunológica adaptativa (MASSON *et al.*; 2010).

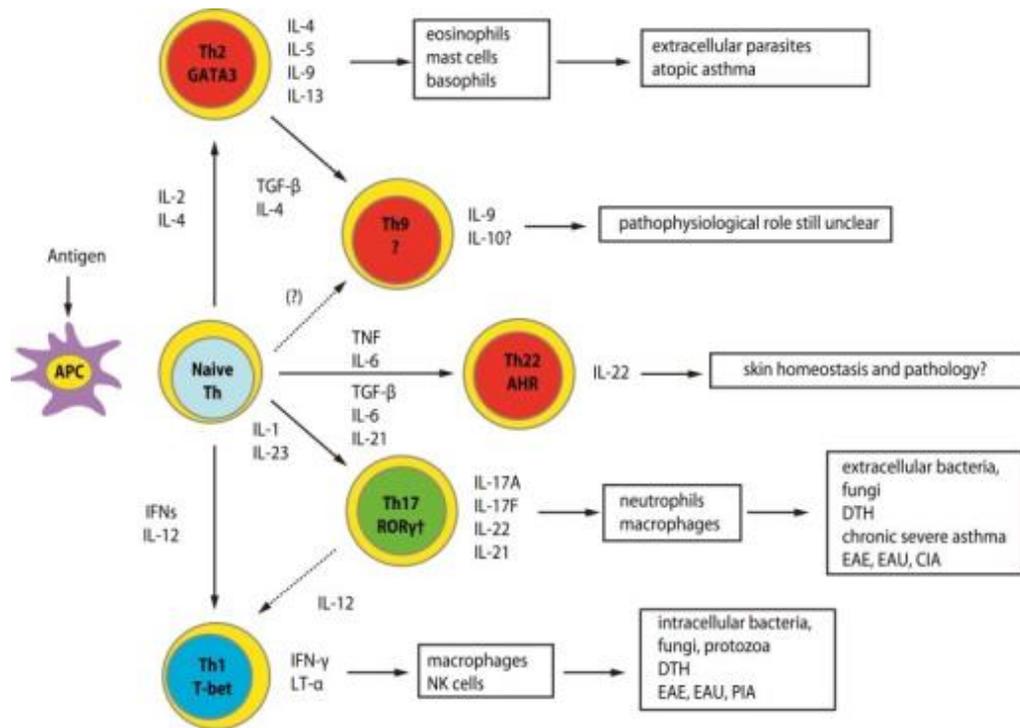


Figura 3 – Subconjuntos funcionais efetores de células TCD4+. Fonte: HASHIZUME, 2012.

A associação entre alelos de antígenos de leucócitos humanos (HLA) específicos e reações severas à algumas medicações têm sido descrita em algumas populações e pode ser explicada pela apresentação de determinados peptídeos por um alelo específico. De acordo com o conceito p-i, a medicação poderia ligar-se a TCRs específicos requerendo uma interação adicional com uma molécula HLA particular. Na ausência desse alelo a medicação poderia ser insuficiente para induzir estimulação imunológica limitando sua ação na hepatotoxicidade (HASHIZUME, 2012).

### 1.3 FATOR DE NECROSE TUMORAL $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória e imunoreguladora que tem um papel chave na resposta imunológica (ELAHI *et al.*, 2009). Essa proteína foi descoberta em 1975 por Carswel *et al.*, sendo secretada por diversos tipos de células, incluindo macrófagos, linfócitos, fibroblastos e queratinócitos, em resposta à inflamação, infecção e outros tipos de estresse ambiental. Seus níveis circulantes

são altamente variáveis e induzem um conjunto heterogêneo de efeitos biológicos de acordo com o tipo de célula alvo (VITALE *et al.*, 2007).

As funções biológicas do TNF- $\alpha$  são relacionadas com a concentração e a duração da exposição dessa molécula. Em quadros clínicos agudos, a produção local de TNF- $\alpha$  é claramente benéfica, aumentando a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e permitindo que células imunológicas, em particular neutrófilos e macrófagos, migrem para sítios do dano tecidual e infecção. Além disso, o TNF- $\alpha$  ativa os fagócitos para eliminar agentes infecciosos e restos celulares. No entanto, a exposição sistêmica e prolongada ao TNF- $\alpha$  pode ser prejudicial (ELAHI *et al.*, 2009).

O aumento da expressão do gene *TNF* tem sido implicado em uma variedade de doenças inflamatórias auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal (SCARDAPANE *et al.*; 2012).

O TNF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína de 26 kDa (pró-TNF) ligada à membrana e é clivada por uma desintegrina metaloproteinase chamada enzima de conversão do TNF- $\alpha$  (TACE) para liberar a molécula solúvel de 17 kDa (ELAHI *et al.*, 2009). Após ser produzido e liberado, o TNF- $\alpha$  se liga a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNFRs) presentes na superfície da célula alvo. A família de TNFRs têm muitos membros, sendo os primeiros descobertos o TNFR1 e o TNFR2 (SCARDAPANE *et al.*; 2012).

A interação do TNF com seus receptores TNFRs é responsável por iniciar diferentes eventos de transdução de sinais intracelulares (Figura 4). A ligação da citocina TNF- $\alpha$  ao receptor TNFR1 recruta a proteína de domínio de morte associada ao TNFR1 (TRADD), que serve como uma plataforma para recrutar pelo menos três mediadores adicionais: proteína de interação com o receptor (RIPK1), proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD), fator de TNF-2 associada ao receptor (TRAF2) (LAWRENCE, 2009). A proteína adaptadora transmite um sinal de ativação do receptor ativado TNFR1 a algumas cascatas de sinalização: cascata caspase com apoptose subsequente, ativação da cascata NF- $\kappa$ B e JNK. O TRADD recruta o FADD e RIPK1 resultando na ativação da cascata caspase seguida por apoptose (SILKE *et al.*, 2015).

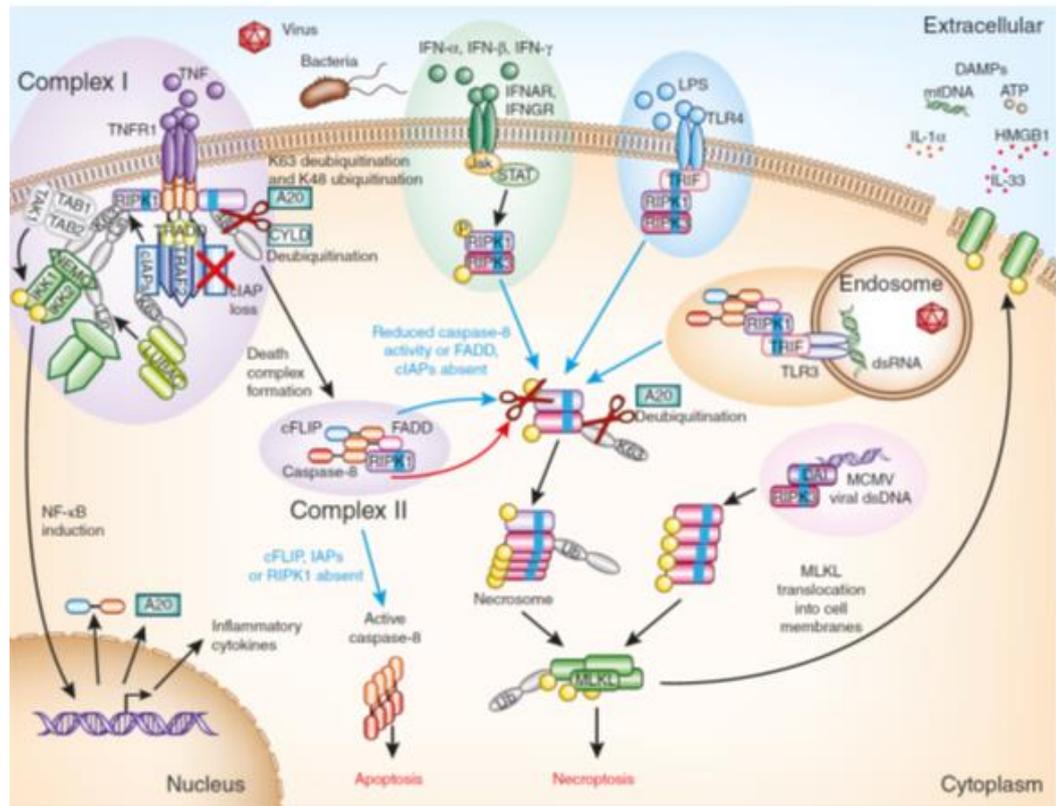


Figura 4 – Vias de sinalização do *TNF*. Fonte: SILKE *et al*, 2015

O principal efeito fisiológico do  $TNF-\alpha$  é promover a resposta imunológica e inflamatória por meio de recrutamento de neutrófilos e monócitos, através da ativação do Fator Nuclear Kappa B ( $NF-\kappa B$ ) (Figura 5) (LAWRENCE, 2009). Após se ligar ao receptor, o  $TNF-\alpha$  estimula a transcrição e a produção da enzima I $\kappa$ B quinase, a qual irá produzir o fator de transcrição  $NF-\kappa B$  que regula a sobrevivência e a proliferação celular por  $TNF$ . O  $NF-\kappa B$  pode ser encontrado em quase todos os tipos de células animais e está envolvido na resposta celular a estímulos como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL, antígenos virais, bacterianos e desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunológica à infecção. Sua regulação incorreta tem sido ligada ao câncer, doenças inflamatórias e auto-imunes (LAWRENCE, 2009).

O  $TNF-\alpha$  também ativa o fator de transcrição AP-1 iniciando a cascata de sinalização JNK e subsequente aumento de proliferação celular (Figura 5) (BASTOS, ROGERO, ARÉAS, 2009).

A ativação das vias NF- $\kappa$ B e JNK resultam no aumento da expressão dos genes que codificam proteínas envolvidas na resposta inflamatória (BASTOS, ROGERO, ARÉAS, 2009).

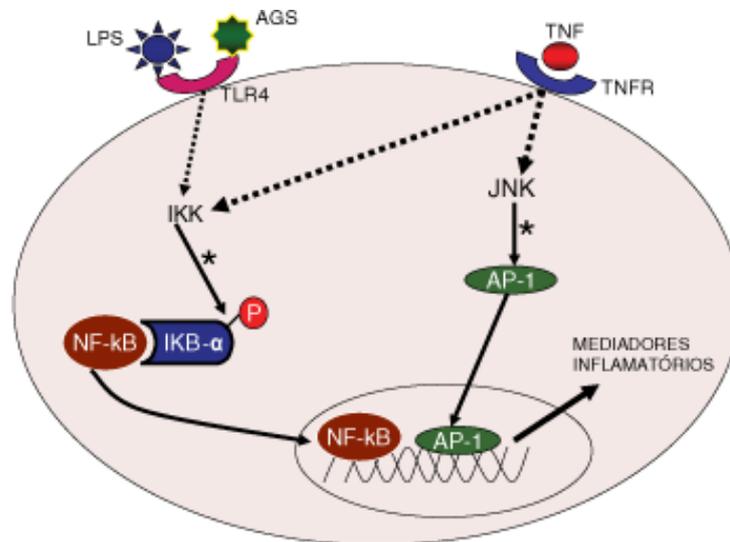


Figura 5. Vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1. Fonte: BASTOS, 2009

### 1.3.1 Gene *TNF*

O gene *TNF* está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), dentro do MHC (ELAHI *et al.*, 2009) (Figura 6).

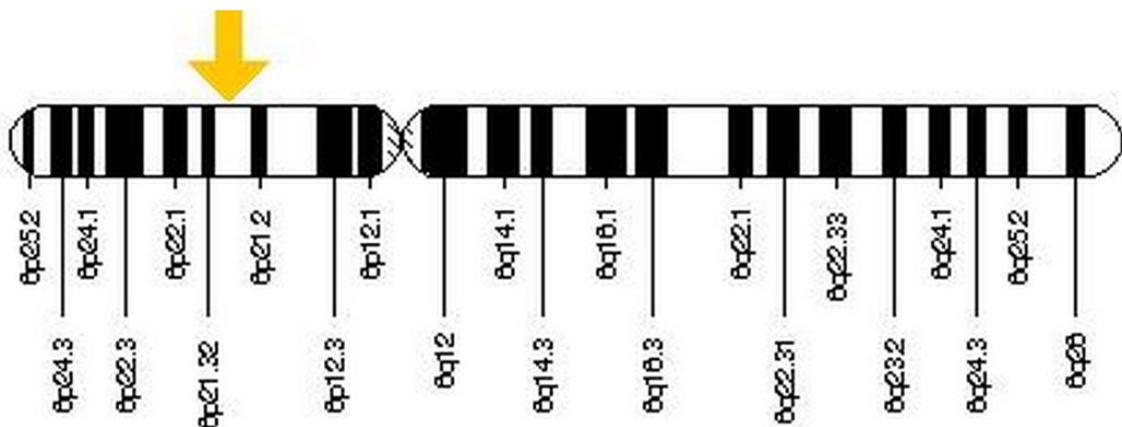


Figura 6 – Localização do gene *TNF* do braço curto do cromossomo 6.

O MHC é composto por um grande aglomerado de genes no braço curto do cromossomo 6, categorizados em três classes com base nas diferenças estruturais e funcionais. Os genes da classe I e II correspondem aos genes HLA, originalmente

descobertos em virtude de sua importância nos transplantes de tecidos entre indivíduos não aparentados (Figura 7) (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

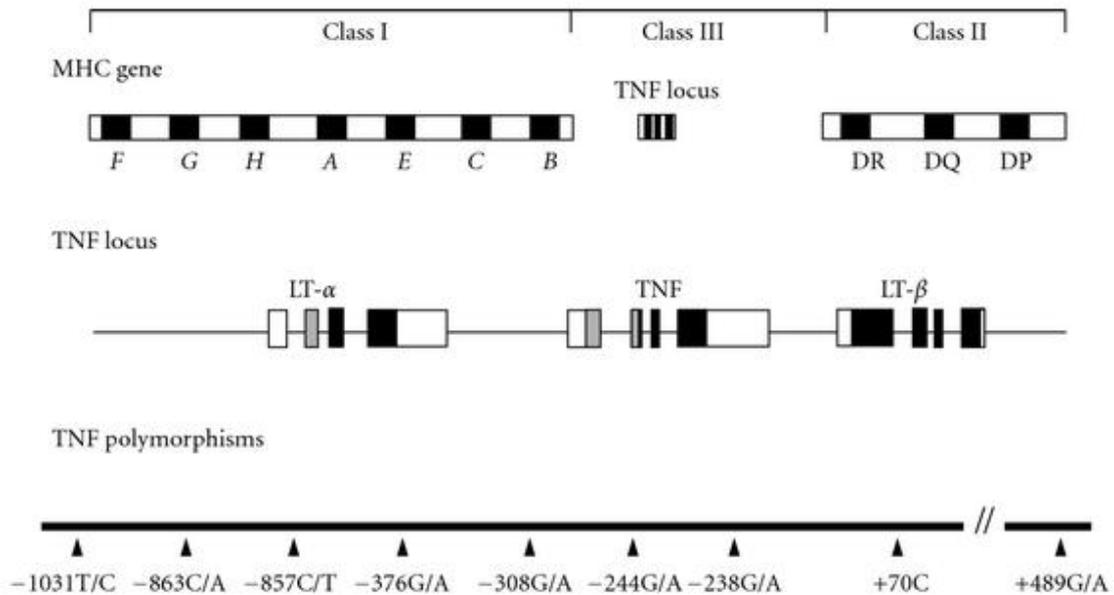


Figura 7 – A localização do gene *TNF* dentro do MHC. Fonte: STONE, INMAN 2001.

A região MHC de classe III, contém numerosos genes que codificam proteínas relacionadas ao sistema imunológico, como proteínas do sistema complemento, citocinas TNF- $\alpha$  (fator  $\alpha$  de necrose tumoral dependente) e TNF- $\beta$  (fator  $\beta$  de necrose tumoral dependente), proteína de choque térmico, além de outras não relacionadas, como enzimas requeridas para a síntese de esteroides entre outras (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

Os genes *LTA*, *TNF* e *LTB* fazem parte da família *TNF*. O gene *LTA* codifica a linfotóxina- $\alpha$ , o *TNF* a citocina TNF e *LTB* codifica a linfotóxina- $\beta$ . Esses genes posicionam-se em tandem, ocupando um segmento de aproximadamente 7kb na região de classe III do MHC (LINSINGEN, 2008).

A família gênica *TNF* assemelha-se em organização genômica, estruturando-se cada um dos genes em quatro éxons, compreendendo individualmente segmentos genômicos de 2,7 a 3,6 Kb, com diferentes sequências flanqueadoras nas extremidades 5' e 3', que ligam diferentes fatores transcricionais, o que se reflete em expressão gênica distinta (LINSINGEN, 2008).

### 1.3.2 Polimorfismos no gene *TNF*

Diversos polimorfismos no gene *TNF* já foram descritos e diferentes estudos têm sido realizados para investigar a relação entre esses polimorfismos e doenças infecciosas, autoimunes e doenças inflamatórias. Entre as doenças investigadas estão malária (FLORI *et al.*, 2003), glaucoma (FUNAYAMA *et al.*, 2004), diabetes (SHBAKLO *et al.*, 2003), choque séptico (MIRA *et al.*, 1999), tuberculose (OLIVEIRA *et al.*, 2004), colesteatoma de orelha média (VITALE *et al.*, 2007), lúpus eritematoso sistêmico (LIN *et al.*; 2009), artrite reumatoide (LLANOS *et al.*, 2005; MOSSAD *et al.*; 2011) e doenças hepáticas autoimunes (LI *et al.*; 2013).

Da mesma forma se investiga a relação dos polimorfismos no gene *TNF* com a hepatite medicamentosa decorrente do uso de diferentes fármacos como paracetamol, ranitidina, amoxicilina-clavulanato, e as medicações anti-tuberculosas (BERNAL *et al.*, 1998; PACHKORIA *et al.*, 2008; TUKOV *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2012).

O polimorfismo na região promotora do *TNF* -308G>A (rs1800629), tem o alelo A associado a uma maior produção da citocina TNF- $\alpha$  (LINSINGEN, 2008), sendo até o momento, o polimorfismo mais estudado em relação a doenças e resposta aos fármacos (AGUILLÓN J.C *et al.*, 2002; ELAHI *et al.*, 2009).

Na população Coreana, KIM e colaboradores, em 2012, investigaram a influência do polimorfismo -308G>A no gene *TNF* com o surgimento de hepatotoxicidade em pacientes com tuberculose tratados com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. Nesse estudo foram comparadas as frequências dos genótipos desse polimorfismo entre 77 pacientes que desenvolveram hepatite e 229 pacientes sem essa reação adversa e encontraram que a frequência de pacientes que possuem o alelo variante A (AG ou AA) foi significativamente maior em pacientes com hepatotoxicidade induzida por essas medicações. Os pacientes portadores do alelo A apresentaram um odds ratio (OR) de 1,94 (IC 95% = 1,04 – 3,63) para o desenvolvimento de hepatite medicamentosa.

Outros três polimorfismos na região promotora do gene *TNF* estão relacionados à mudança no perfil de expressão deste gene (-1031C>T, -238A>C, -857C>T), e podem afetar a produção de TNF- $\alpha$ , criando um desequilíbrio no balanço de citocinas e promovendo, assim, estados de doença (LLANOS *et al.*, 2005).

Diversos estudos mostram a associação do polimorfismo -1031 C>T com doenças infecciosas, auto-imunes e infecciosas, assim como também alguns estudos investigam a correlação desse polimorfismo com os níveis da citocina TNF- $\alpha$  (HAN *et al.*, 2010; GICHOHI-WAINANA *et al.*, 2015; TONG *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2015; SOHAIL *et al.*, 2008; CAY *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2012).

O polimorfismo -238A>G foi associado com a infecção por HBV (LI *et al.*, 2006), a psoríase (JIA *et al.*, 2013), a artrite idiopática juvenil (KAALLA *et al.*, 2013), o carcinoma hepatocelular (GUO *et al.*, 2010), com a doença pulmonar obstrutiva crônica (SAPEY *et al.*, 2010), fator prognóstico no câncer de mama (MALIVANOVA *et al.*, 2013). Foi demonstrado que esse polimorfismo influencia a resposta à terapia anti- TNF em pacientes com espondiloatropatia, psoríase e doença de Crohn (SONG *et al.*, 2015).

Diferentes estudos demonstram que o polimorfismo -857C>T está associado com doenças como diabetes, doença de Crohn, infecção por HBV, artrite psoriática, tuberculose, uveíte, sarcoidose, câncer de colo uterino, câncer de pulmão (WEN *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2011; GIARDINA *et al.*, 2011; ANOOSHEH *et al.*, 2011; KUO *et al.*, 2005; GRUTTERS *et al.*, 2002; YIN *et al.*, 2015; KIYOHARA *et al.*, 2013). Esse polimorfismo também foi associado com a resposta ao tratamento quimioterápico em pacientes com câncer de esôfago (OMATSU *et al.*, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

A hepatotoxicidade induzida por medicações anti-tuberculosas é uma reação adversa grave, de manejo desafiador, que exige hospitalização em alguns casos, podendo ser fatal se o tratamento não for interrompido a tempo. É uma das principais causas de não adesão ao tratamento, podendo facilitar a emergência de bacilos multirresistentes às medicações (CAI *et al.*, 2012).

O Brasil é atualmente o 16º país em número de casos absolutos de tuberculose e disponibiliza o tratamento para essa doença gratuitamente para a população. O melhor conhecimento da biologia molecular da hepatotoxicidade causada por fármacos antituberculose poderá auxiliar na identificação dos indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento dessa reação adversa e na escolha do esquema terapêutico mais adequado para esses pacientes.

Apesar de vários fatores não genéticos influenciarem o desenvolvimento de reações adversas aos medicamentos (como idade, etnia, terapia associada, interações medicamentosas e a natureza da doença) existem atualmente vários exemplos de casos nos quais diferenças individuais na resposta ao fármaco ocorrem devido a variações genéticas (POSSUELO, 2008).

A farmacogenética estuda a variabilidade de resposta aos fármacos, atribuídas a fatores hereditários nas diferentes populações, objetivando identificar perfis genéticos que caracterizam pacientes com maior ou menor risco de apresentar RAMs ou responder melhor ao tratamento farmacológico (MEYER, 2004). Diferentes estudos demonstram que o desenvolvimento de hepatotoxicidade causada por administração da isoniazida em pacientes com tuberculose está associado à variantes genéticas que determinam diferenças da função e da expressão da enzima N-Acetiltransferase 2 (NAT2), com diferenças na acetilação desse fármaco (UPTON *et al.*, 2001; KITA *et al.*, 2001; FERNANDEZ-VILLAR *et al.*, 2003; SANDY *et al.*, 2005; DONALD *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2013), ou está relacionada com a ocorrência de SNPs nos genes *CYP2B6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT2B7*, *ABCB1* e *SLCO1B1* (DESTA *et al.*, 2001; POSSUELO *et al.*, 2008; HASS *et al.*, 2009; FAUCETE *et al.*, 2007; HABTEWOLD *et al.*, 2011; YIMER *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2014).

Além desses genes, o sistema imunológico parece ter um papel importante no desenvolvimento de hepatotoxicidade pelo uso de fármacos de maneira direta ou

indireta (MATOS, MARTINS, 2005; HOLT, JU, 2010; MASSON *et al.*, 2010), entretanto até momento poucos trabalhos investigaram essa ação em pessoas utilizando o tratamento contra a tuberculose (PERWITASARI *et al.*; 2015). O TNF- $\alpha$  possui um papel chave na resposta imunológica e um polimorfismo no gene *TNF* que codifica essa proteína foi associado à hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas na população da Coréia do Sul (KIM *et al.*, 2012).

A influência de genes do sistema imunológico nos efeitos adversos do tratamento da tuberculose nunca foi investigada na população brasileira. A população brasileira é extremamente heterogênea, em consequência de mais de cinco séculos de miscigenação entre três populações ancestrais principais: os europeus, os africanos e os ameríndios autóctones. Por causa dessa miscigenação, a população brasileira apresenta frequências de polimorfismos que variam entre as regiões do país de acordo com a história de colonização (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2012). Na população da Região Norte do Brasil, é observada em média uma contribuição genética européia de 51%, seguida de 32% ameríndia e de 17% de africana (SANTOS *et al.*, 2010), e o estudo de variantes genéticas nessa população precisam considerar o efeito da subestruturação populacional.

O conhecimento de polimorfismos no gene *TNF* que estão envolvidos no risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade por medicações antituberculosas permitirá estabelecer associações com essa reação adversa, e agregar informações importantes para a utilização da farmacogenética no tratamento da tuberculose.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência de polimorfismos na região promotora do gene *TNF* na incidência de hepatotoxicidade em pacientes acometidos por tuberculose tratados com o esquema básico (2RHZE/4RH).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos SNPs - 308G>A, -1031C>T, -238A>G, e -857C>T, do gene *TNF* em pacientes tratados com esquema básico para tuberculose na cidade Belém, Pará.
- Estimar a proporção individual das ancestralidades ameríndia, européia e africana nos pacientes relacionados no estudo.
- Comparar a distribuição de frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos entre pacientes acometidos de tuberculose que apresentaram hepatotoxicidade ao tratamento com esquema básico, com aqueles que não apresentaram hepatotoxicidade a esse esquema.
- Estimar o efeito dos polimorfismos no desenvolvimento de hepatotoxicidade medicamentosa controlando pelo efeito da ancestralidade e outros fatores relevantes.

#### **4 APLICABILIDADE**

O Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), em Belém, é um hospital de referência de tuberculose e atende pacientes encaminhados das unidades de saúde de Belém e do interior do estado do Pará para manejo das reações adversas provocadas pelo esquema básico, entre elas, a hepatotoxicidade.

A hepatotoxicidade é uma reação adversa grave que pode ser causa de troca de medicamentos e aumento do tempo de tratamento, exige hospitalização em alguns casos com tempo prolongado de permanência hospitalar, e até mesmo pode provocar óbito do paciente.

Estudos farmacogenéticos na população da região Norte do Brasil que apresentem associações de variantes genéticas com reações adversas aos medicamentos antituberculose, são importantes para predizer essas complicações antes do início do tratamento. Assim, esse tipo de estudo tem grande importância para que futuramente seja possível desenvolvermos testes genéticos para evitar a ocorrência de hepatotoxicidade, que responde negativamente na qualidade de vida do paciente e onera o sistema de saúde pública.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostra foi constituída por 259 pacientes do Hospital Universitário João de Barros Barreto, diagnosticados com tuberculose e tratados com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol nos primeiros dois meses, seguido de rifampicina e isoniazida por quatro meses (EB).

Os pacientes foram devidamente esclarecidos a respeito da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o qual permite o uso de suas alíquotas de sangue e de seus dados clínicos descritos em nível de prontuário. O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto sob protocolo nº 350507.

Foram incluídos pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar ou extra-pulmonar, confirmada por critérios clínicos e/ou laboratoriais, maiores de 18 anos e excluídos pacientes portadores de doença hepática prévia como HBV, HCV e cirrose hepática. Dados clínicos e epidemiológicos, incluindo sexo, idade, etilismo, tabagismo, comorbidades e uso concomitante de outras medicações foram coletados através de uma entrevista por meio de um questionário padronizado e revisão dos prontuários dos pacientes.

Dor abdominal, náuseas, vômitos, anorexia e icterícia foram considerados sinais e/ou sintomas de reações adversa gastrointestinal. O critério utilizado para o diagnóstico de hepatotoxicidade foi elevação de ALT acima de três vezes o limite superior de referência (ULN) (valor de referência: 0 a 55 UI/ml) na presença de sintomas gastrointestinais, com a normalização dos níveis séricos de ALT após a descontinuação do tratamento antituberculose. Este critério é usado pelos médicos pneumologistas do Hospital Universitário João de Barros Barreto e estão de acordo com as recomendações do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (MS, 2011). A dosagem de ALT foi realizada no laboratório do Hospital Universitário João de Barros Barreto pelo método enzimático automatizado de UV otimizado (IFCC).

Os pacientes diagnosticados com hepatotoxicidade tiveram seu tratamento suspenso. Após o desaparecimento dos sintomas e normalização dos níveis das enzimas hepáticas, esses pacientes receberam esquema especial conforme

preconizado no manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, com a relação bem estabelecida entre a medicação causadora da hepatotoxicidade.

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a resposta às medicações anti-tuberculosas avaliadas durante o tratamento: grupo I com pacientes que não desenvolveram hepatotoxicidade ao esquema básico (controle) e grupo II com pacientes que desenvolveram hepatotoxicidade a esse esquema (casos).

## 5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para cada indivíduo, foram coletados 5mL de sangue periférico usando EDTA como anticoagulante. O material genético foi extraído a partir desta amostra pelo kit de extração AxyPrep™ BloodGenomic DNA Miniprep Kit (AxygenBiotechnology, EUA) e quantificadas com o equipamento NanoDrop 1000 spectrophotometer (Termo ScientificNanoDrop 1000; NanoDropTechnologies, Wilmington, DE).

## 5.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

A análise molecular dos polimorfismos -308G>A (rs1800629), -1031C>T (rs1799964), -238A>G (rs361525), e -857C>T (rs1799724) do gene *TNF*, foi realizada empregando o sistema de PCR em tempo real com ensaios *TaqMan* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Para a discriminação alélica dos polimorfismos foram utilizados os ensaios C\_7514879\_10 (-308 G>A), C\_7514871\_10 (-1031 C>T), C\_2215707\_10 (-238 A>G), C\_11918223\_10 (-857 C>T), conforme as recomendações do fabricante.

## 5.4 MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE

Um painel de 48 Marcadores Informativos de Ancestralidade (IAMs) foi empregado como método de controle genômico de ancestralidade para determinar com precisão o papel de polimorfismos nos genes candidatos em populações miscigenadas da região Norte do Brasil. Os polimorfismos do tipo INDEL foram genotipados, utilizando um PCR do tipo multiplex que permitiu a análise dos mesmos em uma única reação como descrito anteriormente (SANTOS *et al.*; 2010).

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos foram determinadas por contagem direta dos alelos, e em seguida foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). O teste Qui-quadrado de Pearson ou quando necessário o teste exato de Fisher foram usados para fazer a comparação da distribuição da frequência dos alelos e dos genótipos de *TNF* nos subgrupos da população estudada (casos e controles). O teste de Wilcoxon-Mann-Withney foi utilizado para comparar as variáveis quantitativas.

As frequências haplotípicas, o coeficiente de ligação ( $D'$ ) e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) foram determinados utilizando o programa Haploview. Análises estatísticas adicionais foram realizadas usando o software estatístico SPSS v.18. Modelos de regressão logística foram realizados para investigar a associação das variantes genéticas com a hepatotoxicidade. Para estas análises, as covariáveis sexo, idade, uso de outras medicações além das medicações antituberculosas, tabagismo, alcoolismo, comorbidades e ancestralidade foram consideradas como possíveis fatores de confusão. Um nível de significância de 5% foi utilizado para as análises.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes participantes do estudo estão apresentados na tabela 3. A amostra populacional deste estudo foi composta por 68 pacientes com hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas e 191 pacientes que não desenvolveram hepatotoxicidade com o uso das medicações antituberculosas.

Tabela 3 Características clínicas e demográficas dos pacientes com tuberculose que apresentaram hepatotoxicidade e sem hepatotoxicidade.

Características	Pacientes com tuberculose		P
	Com hepatotoxicidade	Sem hepatotoxicidade	
Número amostral	68	191	
Idade	49,5 (15,1)	47,8 (18,1)	0,507 <sup>a</sup>
Sexo (M/F)	33/35 (48,5/51,5)	92/98 (48,4/51,6)	0,988 <sup>b</sup>
Tabagismo	27 (42,9)	40 (22,2)	<b>0,002<sup>b</sup></b>
Etilismo	19 (32,8)	36 (20,0)	0,450 <sup>b</sup>
Comedicação	21 (30,9)	53 (27,7)	0,623 <sup>b</sup>
Comorbidades	28 (41,2)	61 (31,9)	0,168 <sup>b</sup>
HIV	9,(13,2)	6 (3,2)	<b>0,005<sup>b</sup></b>
Diabetes	10 (14,7)	19 (9,9)	0,285 <sup>b</sup>
Doenças cardiovasculares	3 (4,4)	16 (8,4)	0,281 <sup>b</sup>
Doenças respiratórias	3 (4,,4)	9 (4,7)	0,919 <sup>b</sup>

Idade é apresentada como média (desvio padrão) e as outras características são apresentadas como número absoluto (porcentagem)

<sup>a</sup>Teste de Wilcoxon-Mann-Withney

<sup>b</sup>Teste Exato de Fisher

Não houveram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros demográficos tais como idade e sexo entre os pacientes com ou sem hepatotoxicidade. O tabagismo foi mais frequente em pacientes com hepatotoxicidade ( $p = 0,002$ ). O etilismo também foi avaliado e não houve diferenças entre os sub-grupos analisados.

Outras medicações que não as do tratamento para tuberculose, como hipoglicemiantes orais, insulina, sinvastatina, ácido acetilsalicílico e corticoide inalatório, foram utilizadas pelos pacientes. Esses fármacos não são descritos como tendo interações medicamentosas importantes com os fármacos do EB. Não houve diferenças estatisticamente significativas no uso desses fármacos entre os subgrupos analisados indicando que tais medicações não estão influenciando no desencadeamento da hepatotoxicidade.

As principais comorbidades apresentadas pelos pacientes incluídos no estudo foram HIV, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças respiratórias. Quando analisadas em conjunto, não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes com ou sem hepatotoxicidade. Somente existiu diferença entre pacientes que apresentaram HIV. Uma porcentagem maior de pacientes com HIV apresentou hepatotoxicidade ( $p = 0,005$ ).

## 6.2 ESTRUTURA DA POPULAÇÃO

Devido a heterogeneidade da população investigada, uma estimativa da ancestralidade individual foi realizada para todos os indivíduos incluídos no estudo. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as proporções de ancestralidades genéticas entre os pacientes que apresentaram hepatotoxicidade e os pacientes que não apresentaram hepatotoxicidade (Figura 8 e Tabela 4).

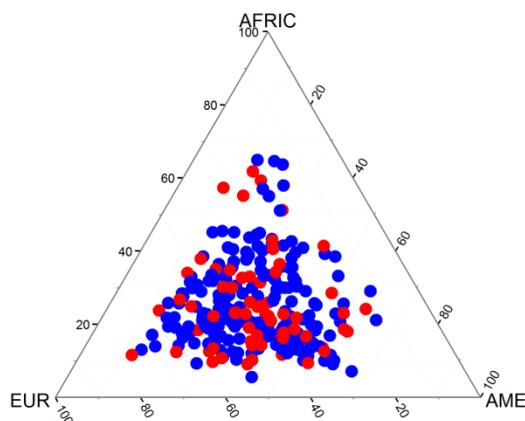


Figura 8. Gráfico triangular das proporções de ancestralidade genômica ameríndia, européia e africana dos pacientes com tuberculose. Indivíduos são representados pelos pontos, e as proporções de miscigenação são indicadas pela distância dos vértices do triângulo. Pacientes que apresentaram hepatotoxicidade estão representados em vermelho e os pacientes que não apresentaram hepatotoxicidade em azul.

Os pacientes apresentaram em média aproximadamente 35% de contribuição ameríndia, 40% de contribuição europeia e 25% de contribuição africana (Tabela 4).

Tabela 4. Médias e variação das proporções genéticas (%) dos grupos pacientes com tuberculose que apresentaram ou não a hepatite medicamentosa.

Ancestralidade	Pacientes				P
	Com Hepatotxicidade		Sem Hepatotxicidade		
Ameríndia	35,1 ± 12,8	(10,9 – 61,0)	33,5 ± 12,6	(13,7 – 66,2)	0,297
Europeia	40,0 ± 12,3	(14,9 – 76,2)	40,9 ± 12,9	(11,4 – 73,3)	0,563
Africana	24,8 ± 12,5	(9,0 – 61,8)	25,5 ± 11,5	(5,5 – 64,9)	0,466

Proporção de ancestralidade (%) apresentada como média ± Desvio Padrão (mínimo - máximo).

### 6.3 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO *TNF*

A distribuição dos genótipos dos SNPs -308A>G, -1031C>T, -238A>G, e -857C>T do gene *TNF* está mostrada na tabela 5. A frequência observada de todos os polimorfismos está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise de desequilíbrio de ligação demonstrou que os polimorfismos não apresentam desequilíbrio na população estudada com valores baixos de  $D'$  e  $r^2$  (figura 9).

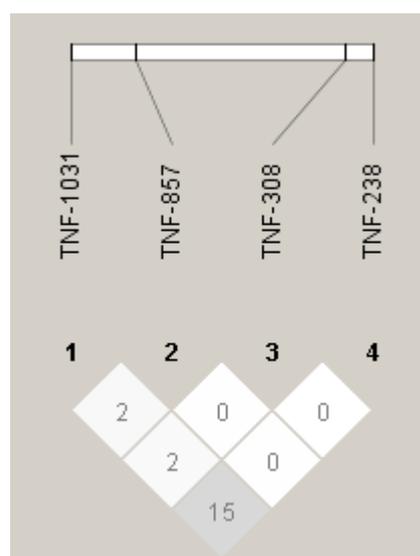


Figura 9 – Estrutura do desequilíbrio de ligação da região promotora do *TNF*. Os números nos losangos indicam o valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) multiplicado por 100. As tendências de cores dos losangos pretos em direção aos brancos indicam diminuição do valor de  $r^2$ .

Comparando a frequência dos genótipos entre os casos e controles, identificou-se uma diferença significativa na distribuição dos genótipos do SNP -1031C>T ( $p = 0,003$ ). A frequência dos homozigotos -1031CC foi maior no grupo caso (8,8%) do que no grupo controle (1,6%). Os outros SNPs do *TNF* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre casos e controles.

Tabela 5 Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de *TNF* nos pacientes com e sem hepatotoxicidade.

SNPs	Genótipos/Alelos	Com		Sem		p-valor*
		hepatotoxicidade (%)		hepatotoxicidade (%)		
-1031	CC	6 (8,8)	3 (1,6)	<b>0,003</b>		
	CT	18 (26,5)	81 (42,4)			
	TT	44 (64,7)	107 (56)			
	C	30 (22,1)	87 (22,8)		0,864	
	T	106 (77,9)	295 (77,2)			
-857	CC	47 (69,1)	140 (73,7%)	0,667		
	CT	19 (27,9)	43 (22,6)			
	TT	2 (2,9)	7 (3,7)			
	C	113 (83,1)	323 (85,0)		0,597	
	T	16,9 (23,0)	57 (15,0)			
-308	AA	1 (1,5)	2 (1)	0,164		
	AG	3 (4,4)	24 (12,6)			
	GG	64 (94,1)	165 (86,4)			
	A	5 (3,7)	28 (7,3)		0,134	
	G	131 (96,3)	354 (92,7)			
-238	AA	2 (2,9)	1 (0,5)	0,083		
	AG	3 (4,4)	21 (11,1)			
	GG	63 (92,6)	168 (88,4)			
	A	7 (5,1)	23 (6,1)		0,699	
	G	129 (94,9)	357 (3,9)			

\*Valores de Teste de Qui-Quadrado de Person ou exato de Fisher quando necessário.

A determinação da associação entre os genótipos de *TNF* e a hepatotoxicidade por medicações antituberculosas, foi realizada por uma regressão logística. Os genótipos com maior frequência dos SNPs -308G>A, -1031C>T, -

238A>G, e -857C>T foram padronizados como referência em comparação aos genótipos heterozigotos e homozigotos. A tabela 6 mostra os resultados da análise de regressão logística múltipla. Os resultados apresentados foram controlados pelas covariáveis etilismo, comedição, tabagismo e HIV. Os pacientes homozigotos -1031CC apresentaram um risco aumentado para o desenvolvimento de hepatotoxicidade quando comparados aos homozigotos -1031TT ou aos portadores do alelo T (OR = 8,6 e OR = 11,3) controlando pelas covariáveis. Os demais SNPs não apresentaram associação com a hepatite medicamentosa.

Tabela 6 – Análise de regressão logística entre os genótipos de referência e os genótipos de risco do *TNF* para o desenvolvimento de hepatite induzida por medicações antituberculosas.

SNPs	Genótipos		OR	IC 95%	P
	Referência	Risco			
-1031	TT	CT	0,649	0,329 – 1,279	0,212
		CC	8,632	1,588 – 47,823	<b>0,014</b>
	TT+CT*	CC	11,355	2,127 – 60,608	<b>0,004</b>
-857	CC	CT	0,748	0,124 – 4,494	0,751
		TT	1,345	0,657 – 2,754	0,417
-308	GG	AG	0,354	0,096 – 1,305	0,119
		AA	1,184	0,090 – 15,588	0,898
-238	GG	AG	0,411	0,109 – 1,552	0,190
		AA	8,732	0,763 – 99,976	0,081

As covariáveis incluídas no modelo de regressão logística foram etilismo, comedição, tabagismo e HIV. \*Modelo Recessivo

## 7 DISCUSSÃO

A citocina TNF- $\alpha$  tem um papel importante na resposta imunológica associada com o desenvolvimento da hepatotoxicidade induzida por medicações (BERNAL *et al.*, 1998; PACHKORIA *et al.*, 2008; TUKOV *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2012), porém poucos estudos têm sido realizados para investigar a associação de polimorfismos no gene *TNF* com essa reação adversa no tratamento com medicações antituberculosas.

No presente estudo foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos do SNP -1031C>T entre os grupos analisados, e um risco aumentado para o desenvolvimento de hepatotoxicidade nos pacientes portadores do genótipo -1031CC. Esse resultado demonstra que o SNP -1031C>T no gene *TNF* é significativamente associado com a hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas, sendo o primeiro trabalho a descrever essa associação em uma população de pacientes no estado do Pará.

O SNP -1031C>T no gene *TNF* já foi associado com doenças inflamatórias, auto-imunes e infecciosas, como doença de Crohn (HAN *et al.*; 2010); malária (GICHOHI-WAINAINA *et al.*; 2015); espondilite anquilosante (TONG *et al.*; 2012); Hanseníase (SILVA *et al.*; 2015); nefropatia diabética (GUPTA *et al.*; 2015). Estudos que investigaram a correlação entre esse polimorfismo e os níveis dessa citocina, demonstram que o alelo C está relacionado a um maior nível de TNF- $\alpha$  em pacientes com infecções pelo *Plasmodium vivax* ou com a síndrome de Sjögren (SOHAIL *et al.*; 2008; CAY *et al.*; 2012). Entretanto, foi demonstrado em indivíduos saudáveis da população chinesa um nível aumentado dessa citocina em portadores do alelo T (CUI *et al.*; 2012). Esses resultados demonstram diferenças na influência desse polimorfismo nos níveis de TNF- $\alpha$  em indivíduos com diferentes estados de saúde ou diferentes populações.

Considerando o nível aumentado de TNF- $\alpha$  observado em portadores do alelo -1031C em indivíduos com doenças crônicas e infecciosas, supõe-se que a influência desse polimorfismo possa levar a um aumento dos níveis dessa citocina em pacientes com tuberculose influenciando o seu tratamento com o esquema básico. Em um estudo realizado por KIM e colaboradores (2012) na população Coreana, os pesquisadores descrevem pela primeira vez a associação de um polimorfismo do gene *TNF*, o SNP -308A>G, com a hepatite induzida por

medicações antituberculosas. Nesse trabalho, os pesquisadores indicam que os níveis de TNF- $\alpha$  elevados associados ao alelo -308A podem estar relacionados à ocorrência de hepatite. No presente estudo, não encontramos associação entre o SNP -308A>G e a hepatite medicamentosa. Essas diferenças encontradas com o estudo realizado por KIM e colaboradores (2012) podem ser decorrentes de diferenças nas metodologias ou nas populações em estudo, entretanto ambos trabalhos demonstram que alelos em variantes genéticas na região promotora do gene *TNF* relacionados ao aumento nos níveis dessa proteína estão associados a hepatite induzida pelos fármacos antituberculose. Os polimorfismos -238A>G e -857C>T não foram associados com a hepatotoxicidade induzida pelas medicações antituberculosas na presente pesquisa e no estudo realizado por Kim e colaboradores (2012), o que parece indicar que esses polimorfismos são menos importantes na modulação do efeito do *TNF* com hepatotoxicidade. Esses resultados em conjunto indicam a importância de polimorfismos nesse gene para a utilização como marcadores moleculares no tratamento da tuberculose.

O TNF- $\alpha$  aumenta o processo inflamatório no fígado pela indução de outras citocinas como IL-1, IL-8 e IFN- $\gamma$ , e pela ligação ao TNFR1 dos hepatócitos. Dessa forma o TNF- $\alpha$  parece induzir a hepatite medicamentosa de forma direta. Apesar disso, também pode ocorrer uma ação dessa citocina de forma indireta gerando uma lesão hepática do tipo imunoalérgica (MASSON *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2012). O presente estudo não teve meios metodológicos para identificar os mecanismos pelos quais o TNF- $\alpha$  desencadeia a hepatite em pacientes tratados com os fármacos do EB. Futuros estudos deverão ser realizados para determinar se essa citocina atua de forma direta ou por reações hapteno-proteína na ocorrência desse efeito adverso.

A presente pesquisa apresenta algumas limitações, dentre as quais salientamos o tamanho da amostra populacional, o que influencia no amplo intervalo de confiança do OR encontrado na análise estatística. Outra limitação foi a impossibilidade da dosagem da citocina TNF- $\alpha$  durante o tratamento dos pacientes para correlação com os polimorfismos do gene *TNF*. Estudos futuros com um número maior de pacientes, dosagem dos níveis da citocina e estudos da expressão gênica poderão esclarecer com mais acurácia o efeito do polimorfismo -1031C>T com o desenvolvimento da hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas.

Os resultados apresentados nessa dissertação demonstram a relevância do sistema imunológico na hepatite induzida por medicações antituberculosas, e a importância de se investigar polimorfismos em genes relacionados ao sistema imunológico para a determinação de biomarcadores para esse efeito adverso.

## 8 CONCLUSÃO

As frequências dos genótipos do gene *TNF* (incluindo os SNPs -308G>A, -1031C>T, -238A>G, e -857C>T) estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada.

As proporções de ancestralidade genéticas entre os pacientes com hepatotoxicidade e sem hepatotoxicidade não são diferentes na população da região Norte e apresentam frequências próximas as das referidas para essa população.

A frequência genotípica do SNP -1031C>T é significativamente diferente entre os pacientes que com hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas e os pacientes sem essa reação adversa, e os indivíduos portadores do genótipo -1031CC apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de hepatotoxicidade nessa população.

Os resultados encontrados no presente trabalho revelam que o polimorfismo -1031C>T no gene *TNF* é significativamente associado com hepatite induzida por medicações antituberculosas e pode ser um fator de risco para o desenvolvimento dessa reação adversa na população do estado do Pará.

## 9 REFERÊNCIAS

AGUILLON, G, Juan, C; CRUZAT, C, Andrea; CUENCA, M, Jimena; CUCHACOVICH, T. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patologia. **Rev.Méd.Chile**, v 130. n.9, p.1043-1050, 2002.

ANOOSHEH, S.; FARNIA, P.; KARGAR, M. Association between TNF-alpha (-857) gene polymorphism and susceptibility to tuberculosis. *Iran Red Crescent Med J*, v.13, n.4, p.243-8, 2011.

BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v.53, n.5, p. 53-55, 2009.

BERNAL, W.; DONALDSON, P.; UNDERHILL, J.; WENDON, J.; WILLIAMS; R. Tumor Necrosis factor genomic polymorphism and outcome of acetaminophen (paracetamol)-induced acute liver failure. **Journal of Hepatology**, v.29, n.1, p.53-9, 1998.

BETHLEM, E. P. **Manifestações clínicas da tuberculose pleural, ganglionar, geniturinária e do sistema nervoso central.** Pulmão RJ, v.21, n.1, p.19-22, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fundação Nacional de Saúde, Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN).** Disponível em: <<http://dtr2015.saude.gov.br/sinan> web> Acesso em 08 julho 2015.

\_\_\_\_\_. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose.** Boletim Epidemiológico, 2015.

\_\_\_\_\_. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose.** Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil, 2011.

\_\_\_\_\_. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica.** Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, 2008.

CAI, YU., YI, J.Y., ZHOU., C., SHEN, X. **Pharmacogenetic study of drug metabolising enzyme polymorphisms on the risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: A meta-analysis.** *PloS One*, v.7, n.10, p. 1-8, 2012.

CAY, H.F.; SEZER, J.; DOGAN, S.; FELEK, R.; ASLAN, M. **Polymorphism in the TNF-alpha gene promoter at position -1031 is associated with increased circulating levels of TNF-alpha, myeloperoxidase and nitrotyrosine in primary Sjögren's syndrome.** *Clin Exp Rheumatol*, v.30, n.6, p843-9, 2012.

CHO, H.; KOH, W.; RYU, Y.; KI, C.; NAM, M.; KIM, J & LEE, S. **Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with tuberculosis drug-induced hepatotoxicity tuberculosis.** *V.87*, n.6, p.551-556, 2007.

CRUVINEL, W.M., DANILO JUNIOR, M., ARAUJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W.S., SILVA, N.P., ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n 4, p. 434-461, 2010.

CUI, G.; WANG, H.; LI, R.; ZHANG, L.; LI, Z.; WANG, Y.; HUI, R.; DING, H.; WANG, D.W. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v.9:235, 2012.

DALCOMO, M.P. **Tratamento da tuberculose sensível e resistente**. Pulmão, RJ, v.21, n.1, p. 55-59, 2012.

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

DAVIES GR.; NUERMBERGER EL. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of anti-tuberculosis drug**. Tuberculosis 88: S 65- S 74, 2008.

DE LA TORRE, C.; SUH OH, H.J. **Advances in the diagnosis of drug eruptions**. Actas Dermosifiliorg, v.104, n.9, p.782-788, 2013.

DENG, G.Y.; MACLAREN, N.K.; HUANG, H. S.; ZHANG, L.P.; SHE, J.X. **No primary association between the 308 polymorphism in the tumor necrosis factor alpha promoter region and insulin-dependent diabetes mellitus**. Hum. Immunol, V.45, N.2, p.137-42, 1996.

DESTA Z.; SOUKHOVA, N. V.; FLOCKHART DA. **Inhibition of cytochrome P450 (CP450), isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A**. Antimicrob Agents Chemother, v.45, n.3, p.382-392, 2001.

DONALD PR.; SIRGEL FA.; VENTER A.; PARKIN DP.; SEI FART HI.; VAN DE WAL BW.; WERWLY C.; VAN HELDEN PD and MARITZ JS. **The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid**. Clinical Infectious Diseases, v.39, n.10, p.1425-30, 2004.

ELAHI, M.M.; ASOTRA, K.; MATATA, B.M.; MASTANA, S.S. **Tumor Necrosis Factor Alpha -308 Gene Locus Promoter Polymorphism: An Analysis of Association with Health and Disease**. Biochim Biophys Acta, v.1792, n.3, p.163-73, 2009.

FAUCETTE, SR.; ZHANG, TC.; MOORE, R et al. **Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers**. J Pharmacol Exp Ther, v.320, n.1, p.72-80, 2007.

FERNANDES, D.C.R.O.F.; SANTOS, N.P.C.; MORAES, M.R.; BRAGA, A.C.O.; SILVA, C.A.; SANTOS, A.R.; SANTOS, S.E.B. **Association of the CYP2B6 gene**

**with anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Brazilian Amazon population.** International Journal of Infectious Disease, v.33, p.28-31, 2014.

FERNÁNDEZ-VILLAR A.; SOPEÑA B, FERNÁNDEZ-VILLAR, J.; VÁZQUEZ-GALLARDO, R.; ULLOA, F.; LEIRO, V.; MOSTEIRO M & PIÑEIRO L. **Isoniazid hepatotoxicity among drug users: the role of hepatitis C.** Clinical Infectious Disease, v.36, n.3 , p.293-298, 2003.

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

FLORI, L., SAWADOGO, S., ESNAULT, C., DELAHAYE, N. F., FUMOUX, F., RIHET, P. **Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in Burkina Faso.** Hum. Molec. Genet., v.12, n.4, p.375-378, 2003.

FUNAYAMA, T., ISHIKAWA, K., OHTAKE, Y., TANINO, T., KURASAKA, D., KIMURA, I., SUZUKI, K., IDETA, H., NAKAMOTO, K., YASUDA, N., FUJIMAKI, T., MURAKAMI, A., *et al.* **Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in Japanese patients with glaucoma.** Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, v.45, n.12, p.4359-4367, 2004.

GENETICS HOME REFERENCE. **Gene TNF.** A service of the U.S. National Library of Medicine®. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TNF>> Acesso em 15 agosto 2015.

GIARDINA, E.; HUFFMEIER, U.; RAVINDRAN, J.; BEHRENS, F.; LEPRE, T.; MCHUGH, N.J.; KORENDOWYCH, E.; BURKHARDT, H.; NOVELLI, G.; REIS, A. Tumor necrosis factor promoter polymorphism TNF\*-857 is a risk allele for psoriatic arthritis independent of the PSORS1 locus. Arthritis Rheum, v.63, n.12, p.3801-6, 2011.

GICHOHI-WAINAINA, W.N.; MELSE-BOONSTRA, A.; FESKENS, E.J.; DEMIR, A.Y.; VEENEMANS, J.; VERHOEF, H. **Tumor necrosis factor allele variants and their association with the occurrence and severity of malaria in African children: a longitudinal study.** Malar J, v.14 (1): 249, 2015.

GOUVEIA, N. **Farmacogenômica / Farmacogenética: realidades e perspectivas na prática clínica.**2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias do Medicamento). Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2009.

GRUTTERS, J.C.; SATO, H.; PANTELIDIS, P.; LAGAN, A.L.; MCGRATH, D.S.; LAMMERS, J.W.; VAN DEN BOSCH, J.M.; WELLS, A.U.; DU BOIS, R.M.; WELSH, K.I. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor -857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. Am J Respir Crit Care, v.165, n.8, p.165-8, 2002.

GUO, Y.M.; YU, W.W.; SHEN, X.Z. Tumor necrosis factor rs361525 (-238G>A) polymorphism contributes to hepatocellular carcinoma susceptibility. *Saudi Med J*, v.31, n.10, p.1101-5, 2010.

GUPTA, S.; MEHNDIRATTA, M.; KALRA, O.P.; SHUKLA, R.; GAMBHIR, J.K. Association of tumor necrosis factor (TNF) promoter polymorphisms with plasma TNF- $\alpha$  levels and susceptibility to diabetic nephropathy in North Indian population. *Journal of Diabetes and its complications*, v.29, p.338-342, 2015.

HABTEWOLD, A.; AMOGNE, W.; MAKONNEN, E.; YIMER, G.; RIEDEL, KD, *et al.* **Long-term effect of efavirenz auto induction on plasma/peripheral blood mononuclear cell drug exposure and CD4 count is influenced by UGT2B7 and CYP2B6 genotypes among HIV patients.** *J Antimicrob Chemother*, v.66, n.10, p.2350-2361, 2011.

HAN, Z.; LI, C.; HAN, S.; HAN, Y.; QIU, J.; SHI, Y.; WANG, J.; SUN, A.; DING, J.; WU, K.; FAN, D. **Meta-analysis: polymorphisms in the TNF-alpha gene promoter and Crohn's disease.** *Aliment Pharmacol Ther*, v.32, n.2, p.159-70, 2010.

HASHIZUME, H. **Recent progress of elucidating the mechanisms of drug hypersensitivity.** *Asia Pac Allergy*, v.2, n.3, p.203-9, 2012.

HASS, D. W.; KOLETAR, S.L.; LAUGHLIN, L.; KENDALL, M.A.; SUCKOW, C., *et al.* **Hepatotoxicity and gastrointestinal intolerance when healthy volunteers taking rifampin add twice-daily atazanavir and ritonavir.** *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.50, n.3, p.290-293, 2009.

HOLT, M.; JU, C. **Drug-induced liver injury.** *Handb Exp Pharmacol*, v.196, p.3-27, 2010.

HOLT, M.P.; JU, C. **Mechanisms of drugs induced liver injury.** *The AAPS Journal*, v.8, n.1, p. E48-E54, 2006.

HUANG, Y.; CHERN, H.; SU, W.; WU, J.; CHANG, S.; CHIANG, C.; CHANG, F & LEE, S. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*, v.37, n.4, p.924-930, 2003.

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

JIA, Y.; QIN, H.J.; ZHANG, J.X.; LIU, L.J. Association of the tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms rs361525 and 1800629 with susceptibility to psoriasis: a meta-analysis. *Clin Exp Dermatol*, v.38, n.8, p. 836-44, 2013.

KAALLA, M.J.; BROADAWAY, K.A.; ROHANI-PICHAVANT, M.; CONNEELY, K.N.; WHITING, A.; PONDER, L.; OKOU, D.T.; ANGELES-HAN, S.; ROUSTER-STEVENSON, K.; BROWN, M.R.; VOGLER, L.B.; JORDE, L.B.; BOHNSACK, J.F.; EPSTEIN, M.P.; PRAHALAD, S. Meta-analysis confirms association between TNFA-G238A variant and JIA, and between PTPN22-C1858T variant and oligoarthritis, RF-

polyarticular and RF-positive polyarticular JIA. *Pediatr Rheumatol Online J*, v.11, n.1:40, 203.

KIM, S-H.; KIM, S-H.; YOON H.J.; SHIN, D.H., PARK, S.S., KIM, Y-S., PARK, J-S., JEE, Y-K. **TNF- $\alpha$  genetic polymorphism -308 G/A and antituberculosis drug-induced hepatitis.** *Liver International*, v.32, n.5, p.809-813, 2012.

KITA, T.; TANIGAWARAY; CHIKAZAWA, S.; HATANAKA, H.; SAKAEDA, T.; KOMADA, F.; IWAKAWA, S., OKUMURA, K. **N-acetyltransferase 2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients.** *Biol. Pharm. Bull*, v.24, n.5, p.544-549, 2001.

KIYOHARA, C.; HORIUCHI, T.; TAKAYAMA, K.; NAKANISHI, Y. Genetic polymorphisms involved in the inflammatory response and lung cancer risk: a case-control study in Japan. *Citokine*, v.65, n.1, p.88-94, 2014.

KUO, N.W.; LYMPANY, P.A.; MENEZO, V.; LAGAN, A.L.; JOHN, S.; YEO, T.K.; LIYANAGE, S.; DU BOIS, RM.; WELSH, K.L.; LIGHTMAN, S. TNF-857T, a genetic risk marker for acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.46, n.5, p.1565-71, 2005.

LAWRENCE, T. **The nuclear factor NF-Kb pathway inflammation.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.1, n.6, a001651, 2009.

LI, H.Q.; LI, Z.; LIU, Y.; LI, J.H.; DONG, J.Q.; GAO, J.R.; GOU, C.Y.; LI, H. Association of -238 G/A and -857 C/T polymorphisms of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter region with outcomes of hepatitis B virus infection. *Biomed Environ Sci*, v.19, n.2, p.133-6, 2006.

LI, S.; HUANG, X.; ZHONG, H.; CHEN, Z.; PENG, Q et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) genetic polymorphisms and the risk of autoimmune liver disease: a meta-analysis. **Journal of Genetics**, v.92, n.3, p.617-628, 2013.

LIN, Y.J.; CHEN, R.H.; WAN, L.; SHEU, J.C.; HUANG, C.M.; LIN, C.W *et al.* **Association of TNF-alpha gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients.** *Lupus*, v.18, n.11, p.974-979, 2009.

LINSINGEN, R.V. **Polimorfismos de genes de citocina e do gene MICA em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical.** 2008, 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná. 2008.

LLANOS, M. C.; *et al.* Papel de os polimorfismos -238 y -308 del promotor del factor de necrosis tumoral alfa em la patogenia y respuesta al tratamiento anti-factor de necrosis tumoral alfa in artritis reumatoide. **Rev. Méd. Chile**, v.133, n.9, p.1089-1095, 2005.

MALIVANOVA, T.F.; SKOROMYSLOVA, E.V.; YURCHENKO, V.A.; KONONENKO, I.V.; MANZYUK, L.V.; MAZURENKO, N.N. Analysis of the -238(G/A) TNF polymorphism in breast cancer patients. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, n.2:13-6, 2013.

MATOS, L.C.; MARTINS, B. Hepatites Tóxicas: revisão da literatura. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, v.7, n.4, p.239-258, 2005.

MASSON, M.J.; COLLINS, L.A.; POHL, L.R. **The role of cytokines in the mechanism of adverse drug reactions**. Handbook of Experimental Pharmacology, v.196, p. 195-231, 2010.

MELO, F.A.F.; SAVIOLI, M.T.G.; KATZ, M.H.; DUARTE, H.; ALMEIDA, E.A. Tuberculose. In: **Tratado de Clínica Médica**. 2 ed, São Paulo, Ed. Roca, 2009, p.2623-61.

MELLO, F.C.Q. **Abordagem diagnóstica da tuberculose pulmonar**. Pulmão, RJ, v.21, n.1, p.27-31, 2012.

MEYER, U.A. **Pharmacogenetics** - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. Nature Reviews Genetics 5, p.669-676, 2004.

MIRA, J.-P., CARIOU, A., GRALL, F., DELCLAUX, C., LOSSER, M.-R., HESHMATI, F., CHEVAL, C., MONCHI, M., *et al.* **Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study**. JAMA, v.282, n.6, p.561-568, 1999.

MOSSAD, Y.M.; ABDELSALAM, A.; EI-BASSIONY, S.R. Association of tumor necrosis factor-alpha -308G/A promoter polymorphism with susceptibility and disease profile of rheumatoid arthritis. Int. J. Immunogenet, v.38, n.5, p.427-433, 2011.

NUSSBAUM, R.L.; Mc INNES R.R.; WILLARD, H.F. **Variação genética em indivíduos e populações: mutação e polimorfismo**. In: Thompson & Thompson. Genética Médica, 2008, 7 ed, Ed Elsevier, p.181-214.

OLIVEIRA, A.M.; *et al.* Farmacogenética e farmacogenômica da biotransformação de drogas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.39-41, 2006.

OMATSU, H.; KUWAHARA, A.; YAMAMORI, M.; FUJITA, M.; OKUNO, T.; MIKI, I.; TAMURA, T.; NISHIGUCHI, K.; OKAMURA, N.; NAKAMURA, T.; AZUMA, T.; HIRANO, T.; OZAWA, K.; HIRAI, M. TNF- $\alpha$  -857C>T genotype is predictive of clinical response after treatment with definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. Int J Med Sci, v.15, n.10, p. 1755-60, 2013.

PACHKORIA, K.; LUCENA, M.I.; CRESPO, E, *et al.* **Analysis of IL-10, IL-4 and TNF-alpha polymorphisms in drug-induced liver injury (DILI) and its outcome**. J Hepatol, v.49, n.1, 2008.

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

PERWITASARI, DA.; ATTHOBARI, J.; WILFFERT, B. **Pharmacogenetics of isoniazid-induced hepatotoxicity**. Drug Metab Ver, v.47, n.2, p.222-8, 2015.

- PILLER, R.V.B. **Epidemiologia da Tuberculose**, Pulmão RJ, v.21, n.1, p.4-9, 2012.
- POSSUELO, L.G.; CASTELAN, J.A, DE BRITO, T.C.; RIBEIRO, A.W.; CAFRONE, P.I, *et al.* **Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil**. *Eur J Clin Pharmacol*, v.67, n.7, p.673-81, 2008.
- RAHBAR KAFSBORAN, H.; BONYADI, M.; MIRI, H.; HAGHI, M.; NIKRAVESH, A.; ABDOLMOHAMMADI, R.; HOSSEIN SOMI, M.; KHOSHBATEN, M. Association of TNF- $\alpha$  -857 polymorphism with inflammatory bowel disease in a group of Iranian Azeri individuals. *Middle East J Dig Dis*, v.6, n.1, p.28-31, 2014.
- RISSATO, M.D.A.R.; ROMANO-LIEBER, N.S & LIEBER, R.R. **Terminologia de incidentes com medicamentos no contexto hospitalar**. *Caderno de Saúde Pública*, v.24, n.9, p.1965-1975, 2008.
- ROSEMBERG, J.; TARANTINO A.B.; SOBREIRO, MC. Tuberculose. In: **Tarantino AB Doenças Pulmonares**. 6 ed. Rio de Janeiro. Ed Guanabara Koogan, 2008, p.266-330.
- SANDY J.; HOLTON S.; FULLAM E.; SIM E and NOBLE M. **Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine N-acetyltransferase protein from Mycobacterium smegmatis**. *Protein Sci*, v.14, n.3, p.775-782, 2005.
- SANT'ANNA C.C. **Tuberculose na infância e na adolescência**. Editora Atheneu, 227 pp. 1985.
- SANTOS, N.P.C.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; RIBEIRO DOS SANTOS, A.K.C.; SILVA, C.A.; VALLINOTO, A.C.R.; FERNANDES, D.C.R.O.; CARVALHO, D.C.; SANTOS, S.E.B.; HUTZ, M.H. **N-acetyl-transferase 2 and cytochrome P4502 E1 genes and isoniazid-induced hepatotoxicity in Brazilian patients**. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.17, n.4, p.499-504, 2013.
- SANTOS, N.P.C.; RIBEIRO RODRIGUES, E.M.; RIBEIRO DOS SANTOS, A.K.C.; PEREIRA, L.; GUSMÃO, L.; AMORIM, A.; GUERREIRO, J.F.; ZAGO, M.A.; MATTE, C.; HUTZ, M.H.; SANTOS, SE. **Assessing individual interethnic admixture and population structure using a 48 insertion-deletion ancestry informative markers panel**. *Human mutation*, v.31, n.2, p.184-190, 2010.
- SAPEY, E.; WOOD, A.M.; AHMAD, A.; STOCKLEY, R.A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, v.182, n.2, p.192-9, 2010.
- SCARDAPANE, A.; BREDI, L.; LUCANTONI, M.; CHIARELLI, F. **TNF- $\alpha$  polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis: what potential clinical implications?** *International Journal of Rheumatology, Artigo de Revisão*, v.2012, Article ID 756291, 16 pages, 2012.

SHARMA, S.; BALAMURUGAN, A.; SAHA, P.; PANDEY, R. & MEHRA, N. **Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v.166, n.7, p.916-1119. 2002.

SHBAKLO, H.; AZAR, S.T.; TERWEDOW, H.; HALABY, G.; NAJA, R.P.; ZALLOUA, P.A. **No association between the -1031 polymorphism in the TNF-alpha promoter region and type 1 diabetes.** Hum. Immun, 64:633-638, 2003.

SHI, K.Q.; CAI, X.H.; XIAO, D.D.; WU, S.J.; PENG, M.M.; LIN, X.F.; FAN, Y.C.; CHEN, Y.P.; ZHENG, M.H. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -857T allele reduces the risk of hepatitis B virus infection in an Asian population. J Viral Hepat, v.19, n.2, p.66-72, 2012.

SILKE, J.; RICKARD, JA & GERLIC, M. **The diverse role of RIP Kinases in necroptosis and inflammation.** Nature Immunology, v.16, n.7, p.689-697, 2015.

SILVA, J.R.L. **Novos aspectos da patogenia da tuberculose.** Pulmão RJ, v.21, n.1, p.10-14, 2012.

SILVA, G.A.V.; RAMASAWMY, R.; BOECHAT, A.L.; MORAIS, A.C.; CARVALHO, B.K.S.; SOUSA, K.B.P.; SOUZA, V.C.; CUNHA, M.G.S.; BARLETTA-NAVECA, R.H.; SANTOS, M.P.; NAVECA, F.G. **Association of TNF-1031C/C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brasil.** Human Immunology, v.76, p.137-141, 2015.

SIQUEIRA, H.R. **Enfoque clínico da tuberculose pulmonar.** Pulmão RJ, v.21, n.1, p.15-18, 2012.

SOHAIL, M.; KAUL, A.; BALI, P.; RAZIUDDIN, M.; SINGH, M.P.; SINGH, O.P.; DASH, A.P.; ADAK, T. **Alleles - 308A and -1031C in the TNF-alpha gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF-alpha and clinical features of vivax malaria in Indian patients.** Molecular Immunology, v.45, p.1682-1692, 2008.

SONG, G.G.; SEO, Y.H.; KIM, J.H.; CHOI, S.J.; JI, J.D.; LEE, Y.H. Association between TNF- $\alpha$  (-308 A/G, -238 A/G, -857 C/T) polymorphisms and responsiveness to TNF- $\alpha$  blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. Pharmacogenomics, v.5, p. 1-11, 2015.

STONE, M.A.; INMAN, R.D. **The genetics of cytokines in Ankylosing Spondylitis.** The Journal of Rheumatology, v.28, n.6, p.1203-6, 2001.

SUAREZ-KURTZ, G., PENA, S.D.J., STRUCHINER, C.I.; HUTZ, M.M. **Pharmacogenomic diversity among Brazilians: influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin.** Front Pharmacol, v.3, p.1-7, 2012.

TONG, Q.; ZHAO, DB.; BAIRACHARYA, P.; XU, X.; KONG, R.N.; ZHANG, J.; DAI, S.M.; CAI, Q. **TNF- $\alpha$  -857 and -1031 polymorphisms predict good therapeutic response to TNF- $\alpha$  blockers in Chinese Han patients with ankylosing spondylitis.** *Pharmacogenomics*, v.13, n.13, p.1459-67, 2012.

TOSTMANN, A.; VAN DEN BOOGAARD, J.; SEMVUA, H.; KISONGA, R.; KIBIKI, G.S.; AARNOUTSE, RE.; BOEREE, M.J. **Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity is uncommon in Tanzanian hospitalized pulmonary TB patients.** *Trop Med Int Health*, v.15, n.2, p.268-72, 2010.

TUKOV F.F.; LUYENDYK, J.P.; GANEY, P.E.; ROTH, R.A. **The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury.** *Toxicological Sciences*, v.100, n.1, p.267-280, 2007.

UPTON AM.; MUSTAQ A.; VICTOR TC.; SAMPSON SL.; SANDY J.; SMITH D-M.; VAN HELDEN PV and SIM E. **Arylamine N-acetyltransferase of Mycobacterium tuberculosis is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism.** *Mol Microbiol*, v.42, n.2, p.309-317, 2001.

VITALE, R.V.; ANDRADE, F.; RIBEIRO, Q. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Rev. Bras. Otorrinolaringologia**, v.73, n.1, p.123-127, 2007.

YIMER G.; UEDA, N.; HABTEWOLD A. *et al.* **Pharmacogenetic & Pharmacokinetic biomarker for efavirens based ARV and rifampicin based anti-TB drug induced liver injury in TB-HIV infected patients.** *PloS One*, v.6 n.12, e27810, 2011.

YIN, G.; ZHU, T.; LI, J.; WU, A.; LIANG, J.; ZHI, Y. CXCL12 rs266085 and TNF- $\alpha$  rs1799724 polymorphisms and susceptibility to cervical cancer in a Chinese population. *Int J Clin Exp Pathol*, v.8, n.5, p.5768-74, 2015.

WEN, P.F.; WANG, X.S.; ZHANG, M.; CEN, H.; PAN, H.F.; YE, Q.L.; MAO, C.; YE, D.Q. Associations between TNF gene polymorphisms (-308 A/G, -238 A/G, -1031 C/T and -857 T/C) and genetic susceptibility to TD1: a meta-analysis. *Endocrine*, v.46, n.3, p.435-44, 2014.

WIRTH, T.; *et al.* **Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex.** *Plos Pathog* 4: e 1000160, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.** WHO report. 2014.

## 10 ANEXOS

### ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Título de Projeto: “Investigação de polimorfismos no gene *TNF* em pacientes com hepatotoxicidade induzida por medicações antituberculosas no Norte do Brasil ”.
2. Esta pesquisa tem como objetivo identificar polimorfismos genéticos que possam estar associados à susceptibilidade ao desenvolvimento de hepatite medicamentosa durante tratamento da tuberculose.
3. A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, sendo garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.
3. O voluntário será submetido à punção de veia periférica do antebraço, com material descartável, para coleta de 5mL de sangue para análise. A coleta de sangue é de pequena quantidade e por isso dificilmente causará algum mal estar, no entanto, poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma.
4. As amostras serão enviadas ao Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Oncologia, onde serão realizadas a extração e a quantificação do DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise molecular dos polimorfismos, além da análise estatística.
5. Não há benefício direto para o participante, pois se trata de um estudo prospectivo, que testa a hipótese de que determinados polimorfismos genéticos possam estar relacionados com o desencadeamento de hepatite medicamentosa durante o tratamento para tuberculose.
6. Os participantes podem ter acesso em qualquer fase da pesquisa, aos profissionais responsáveis pelo estudo, para esclarecimentos. O principal investigador é a Dr<sup>a</sup> Sônia Elenita Lopes Valente, que pode ser encontrada no endereço Rua dos Mundurucus, 4487, telefone: 3201-6795.

7. Não haverá nenhum pagamento aos pacientes que concordarem em participar da pesquisa, bem como os participantes da pesquisa não terão nenhum custo adicional relacionado aos exames realizados.
8. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
9. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e desistência de participação do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.
10. O paciente tem direito de querer ser mantido atualizado sobre os resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
11. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelo procedimento proposto neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
13. Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar. No entanto, se houver alguma dúvida estas poderão ser esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dr<sup>a</sup> Sônia Elenita Lopes Valente pelo telefone : 3201-6795.
14. A sua assinatura abaixo significa que você concorda em participar da pesquisa, entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

---

Assinatura do paciente

Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Assinatura de quem colheu o TCLE

Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO CLÍNICO - EPIDEMIOLÓGICO**

1. Número de matrícula: \_\_\_\_\_
2. Número da amostra: \_\_\_\_\_
3. Nome: \_\_\_\_\_
4. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
5. Naturalidade: \_\_\_\_\_
6. Procedência: \_\_\_\_\_
7. Gênero (1) masculino (2) feminino
8. Tosse seca (1) sim (2) não
9. Tosse produtiva (1) sim (2) não
10. escarros hemoptóicos (1) sim (2) não
11. hemoptise (1) sim (2) não
12. Febre (1) sim (2) não
13. Emagrecimento (1) sim (2) não
14. Tabagismo (1) sim (2) não
15. Etilismo (1) sim (2) não
16. Hepatopatia (1) sim (2) não
  - hepatite B (1)sim (2) não
  - hepatite C (1)sim (2) não
  - cirrose (1) sim (2) não
17. Uso de outras medicações (1) sim (2) não
  - Quais? \_\_\_\_\_
18. Comorbidades (1) sim (2) não

19. Diabetes (1) sim (2) não

20. HIV (1) sim (2) não

21. Doenças respiratórias (1) sim (2) não

22. Doenças cardiovasculares (1) sim (2) não

23. Outras comorbidades (1) sim (2) não

- Qual? \_\_\_\_\_

24. Forma de TB atual (1) Pulmonar (2) Extra-pulmonar

25. Tipo de TB Extra-pulmonar : \_\_\_\_\_

26. Resultado de exames :

- TGO (1) Normal (2) Alterado

- TGP (1) Normal (2) Alterado

- BD (1) Normal (2) Alterado

- BT (1) Normal (2) Alterado

- Sorologia para Hepatite B (1) Normal (2) Alterado

- Sorologia para Hepatite C (1) Normal (2) Alterado

27. Hepatotxicidade (1) sim (2) não

Responsável pelo preenchimento: