

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

YASMIN DE OLIVEIRA PONTUAL

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE
***ABCB1* ASSOCIADOS A FATORES CLÍNICOS COMO**
PREDITORES DA TUBERCULOSE-RESISTENTE

Rio de Janeiro

2017

DISSERTAÇÃO MPCDI – INI Y.O. PONTUAL

2017

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE
ABCB1 ASSOCIADOS A FATORES CLÍNICOS COMO
PREDITORES DA TUBERCULOSE-RESISTENTE**

YASMIN DE OLIVEIRA PONTUAL

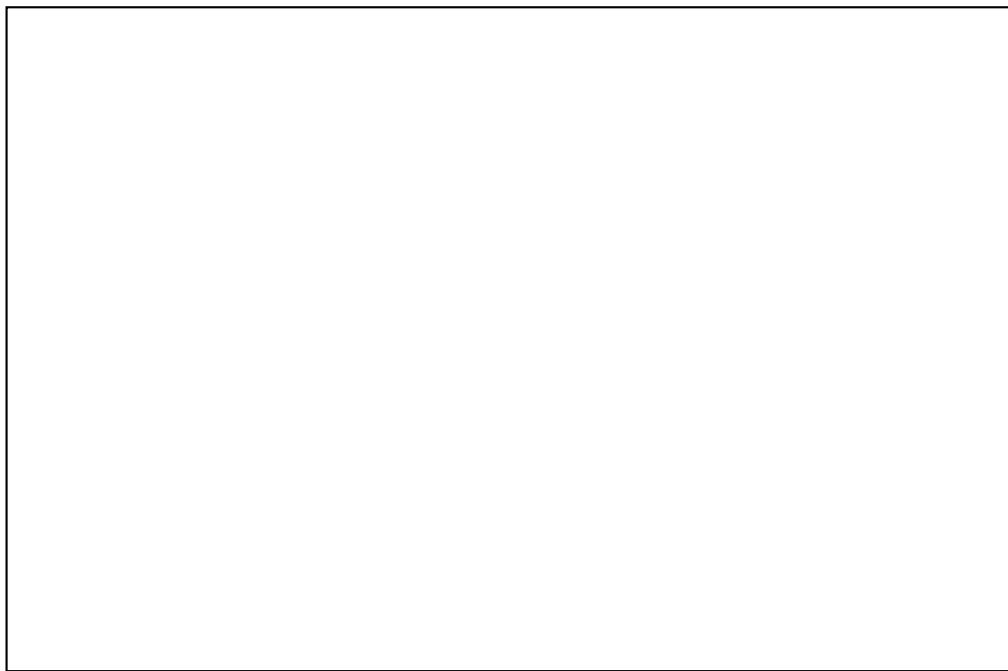
Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Profa. Dra. Valéria Cavalcanti Rolla; Profa. Dra. Liane de Castro.

Rio de Janeiro

2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FOCRUZ – RJ



AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *ABCBI* ASSOCIADOS A FATORES CLÍNICOS COMO PREDITORES DA TUBERCULOSE-RESISTENTE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador (as): Profa. Dra. Valeria Cavancalti Rolla

Profa. Dra. Liane de Castro

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marli Jane Martins Costa (Presidente e Revisora)

Doutora em Medicina Interna/Pneumologia

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/FIOCRUZ

Profa. Dra. Kenia Balbi El-Jaick (Membro)

Doutora em Ciências Biológicas/Genética

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira (Membro)

Doutora em Ciências/Microbiologia

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/FIOCRUZ

Dr. Sérgio Pereira Monteiro (Suplente)

Doutor em Ciências

Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

*Dedico este trabalho à memória de meu Pai Evaldo,
que sempre me mostrou que o conhecimento é a arma mais poderosa do mundo!*

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradecer a Deus por mais uma conquista.

Meu marido Hugo que soube aturar meus momentos de estresse, que soube me tranquilizar nos momentos de desespero, que soube me amparar nos momentos de tristeza e principalmente soube me apoiar quando eu achei que tudo estivesse perdido.

Minha orientadora e mais que amiga Dra. Liane de Castro faltam-me palavras para agradecer por todo o apoio e incentivo. Só tenho a aprender com você, como uma grande profissional que ama o que faz e principalmente como um grande ser humano. Espero que no meu futuro eu seja metade da pessoa que você é, e faça metade do bem que você faz as pessoas que estão ao seu redor.

Minha família que me ajudaram a subir cada degrau da minha vida.

A equipe do Laboratório de Farmacogenética, tenho certeza que todos os percalços enfrentados no dia a dia não seriam os mesmos se não fosse junto com vocês.

A minha Orientadora Valéria Rolla, por todo minuto de ensino dedicado a mim.

Aos meus amigos do mestrado, que com certeza fizeram com que tudo fosse muito mais leve do que realmente é.

Obrigada a todos que direta e indiretamente me ajudaram a escrever mais uma página da minha história!

“Durante nossa breve existência nesse mundo devemos nos ocupar de todos os esforços para que faça sentido nossa vida, senão, seremos apenas mais um ser que um dia existiu nesse mundo” (Alexsandro Rego).

RESUMO

Os polimorfismos no gene *ABCB1* que codifica uma glicoproteína P transmembranar (P-gp) com função de bomba de efluxo de fármaco, tem sido amplamente estudado na resistência aos fármacos antineoplásicos substratos de P-gp. Esses polimorfismos influenciam na atividade e expressão da P-gp alterando a biodisponibilidade de fármacos. A resistência aos medicamentos para o tratamento da tuberculose (TB) tornou-se um problema de saúde pública mundial representando um desafio para o controle efetivo da TB. O esquema de primeira linha para o tratamento da TB inclui a rifampicina e o etambutol, fármacos substrato da P-gp, assim, pressupomos que a resistência do hospedeiro aos fármacos de primeira linha anti-TB poderia ser explicada pelas alterações nas concentrações intracelulares das drogas, devido aos polimorfismos do gene *ABCB1* podendo estarem associados ou não a outros fatores de risco. De acordo com o resultado da cultura e teste de sensibilidade a antibióticos foram analisados 218 pacientes, 80 com resistência a rifampicina e/ou etambutol associados ou não a outros fármacos de primeira linha anti-TB, formaram o grupo de casos e 138 pacientes, o grupo controle. As frequências do genótipo/alelo/haplótipo nos loci c.1236C> T (rs1128503), c.2677G> T/A (rs2032582) e c.3435C>T (rs1045642) foram determinadas pela técnica de sequenciamento direto e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). Um nomograma foi construído para representar o conjunto das variáveis combinadas que definem a previsão de resistência aos fármacos anti-TB. Os resultados mostraram que, o genótipo CT (rs1128503) [p=0,02], a forma clínica pulmonar (p= 0,03), o tratamento prévio da tuberculose (p=0,01) e a cor da pele não-branca (p = 0,03), prevê a chance de 90% para a TB-resistente. A resistência ao etambutol está associada ao alelo raro "A" (rs2032582) (OR: 12,91 p= 0,01) a qualquer haplótipo contendo esse alelo (OR: 7,17 p= 0,04) e ao haplótipo TTC (OR: 5,83, p= 0,05). Sendo assim, a implementação da genotipagem de *ABCB1* na prática clínica e o uso do nomograma construído poderiam contribuir para redução da tuberculose-resistente.

ABSTRACT

Polymorphism in *ABCB1* gene encoding P-glycoprotein, a transmembrane drug efflux pump, contributes to drug resistance and have been widely studied, however, their association with rifampicin and ethambutol resistance in tuberculosis patients are still unclear. Genotype/allele/haplotype frequencies in c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) and c.3435C>T (rs1045642) were obtained from 218 patients, of these, 80 patients with rifampicin and/or ethambutol resistance were selected as case group and 138 control-group through the result of their culture and drugs sensitive test. Patients aging <18 years old and HIV positive serologic test were excluded. The *ABCB1* polymorphisms were determined using a polymerase chain reaction, direct sequencing approach and restriction fragment length polymorphism. A nomogram was constructed to simulate a combined prediction of probability to anti-tuberculosis drug resistance, genotype c.1236C> T (rs1128503) (p= 0.02), clinical form (p= 0.03), previous treatment (p=0.01) and skin color (p = 0.03), have a chance of up to 90% of developing anti-tuberculosis drug resistance. Considering genotype analyzes, CT (rs1128503) demonstrated an increased chance to anti-tuberculosis drugs resistance (odds ratio: 2.34, p= 0.02), while the analyses for ethambutol resistance revealed an association of rare allele “A” (rs2032582) (odds ratio: 12.91, p=0.01), the haplotype TTC (odds ratio: 5.83, p= 0.05) and any haplotype containing the rare allele “A” (odds ratio: 7.17, p=0.04). The *ABCB1* gene polymorphisms in association with others risk factors contribute to anti-tuberculosis drugs resistance mainly ethambutol. The use of the nomogram described in this study could contribute to the clinical decision before starting tuberculosis treatment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Mycobacterium tuberculosis: coloração de Ziehl-Neelsen
- Figura 2** Membrana plasmática com transportadores de membrana
- Figura 3** Modelo de transportador ABC
- Figura 4** Modelos propostos para mecanismos de efluxo de fármacos pela P-gp
- Figura 5** Distribuição da P-gp no organismo humano
- Figura 6** Função da P-gp em diferentes tecidos
- Figura 7** Representação dos fatores envolvidos com as diferentes formas interindividuais de resposta às drogas
- Figura 8** Representação esquemática de polimorfismo de único nucleotídeo
- Figura 9** Localização dos polimorfismos no gene *ABCB1*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Esquema básico para o tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes
- Tabela 2** Esquema de tratamento para tuberculose multirresistente (TBMR) segundo o manual de recomendações para o controle da TBMR, 2010.
- Quadro 1** Substratos e inibidores de P-gp

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	<i>do inglês deoxyribonucleic acid</i>
PGP	Glicoproteína-P <i>do inglês permeability glycoprotein</i>
ABC	<i>do inglês ATP binding cassette</i>
TB	Tuberculose
AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida <i>do inglês acquired immunodeficiency syndrome</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
TBMDR	Tuberculose multidrogarresistente
R	rifampicina
E	etambutol
TSA	Teste de sensibilidade a antibióticos
ODM	Objetivos de desenvolvimento do milênio
ONU	Organização das nações unidas
OMS	Organização mundial de Saúde
DOTS	Tratamento diretamente observado
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TBMR	Tuberculose multirresistente
ATP	Adenosina trifosfato
MNT	Micobacterioses não tuberculosas
TMD	Domínios transmembranares
NBDS	domínios de ligação a nucleótidos
MDR	<i>do inglês multidrug resistance</i>
AUC	Área sob a curva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Mycobacterium tuberculosis	17
2.1.1 Tuberculose	18
2.1.2 Resistência ao tratamento da tuberculose.....	23
2.2 Transportadores de Membrana	27
2.2.1 Família ABC.....	28
3. Gene <i>ABCB1/MDR1</i>	30
3.1 Relevância da Farmacogenética: Impacto dos Polimorfismos do Gene <i>ABCB1</i>	31
3.2 Glicoproteína-P.....	35
3.2.1 Interações farmacológicas na Glicoproteína-P	38
4. OBJETIVOS.....	42
4.1 OBJETIVO GERAL.....	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5. RESULTADOS	43
6. ORIGINAL ARTICLE.....	44
7. CONCLUSÕES	67
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
9. REFERÊNCIAS	71
ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	76
ANEXO 2: Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa(CEP).....	80

1.INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos atua a partir da interação com proteínas transportadoras ou enzimas do metabolismo as quais determinam a absorção, distribuição, excreção, chegada ao sítio de ação e a resposta farmacológica (MANCINELLI; CRONIN; SADÉE, 2000).

Numa determinada população, respostas imprevistas a medicamentos podem ocorrer devido às peculiaridades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, decorrentes de um polimorfismo genético (METZGER; SOUZA-COSTA; TANUS-SANTOS, 2006).

A resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos esquemas terapêuticos em uso vem se tornando cada vez mais frequente, representando a maior ameaça à efetividade da terapia. Isso torna o tratamento mais longo e conseqüentemente mais dispendioso. Por serem mais tóxicas, as drogas de segunda linha causam efeitos secundários mais intensos ao paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Sugerindo-se que o fenômeno de resistência seja gerado basicamente por tratamentos anteriores mal conduzidos, porém sabe-se que a questão é mais ampla e complexa, uma vez que pacientes tratados com as mesmas drogas apresentam variabilidade de resposta e de susceptibilidade à toxicidade medicamentosa (METZGER; SOUZA-COSTA; TANUS-SANTOS, 2006).

Os principais fatores que levam à resistência simultânea a várias drogas são: expulsão da droga após ela ter penetrado na membrana plasmática através de bombas de efluxo, captação reduzida, alteração nas enzimas-alvo, alteração do metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA ou ainda a falha dos mecanismos regulatórios de morte celular programada (apoptose). De todos esses mecanismos, um dos observados é através das bombas de efluxo do hospedeiro, entre elas a Glicoproteína-P (P-gp) (GODMAN & GILMAN, 2012)

Entre os transportadores mais bem conhecidos, destaca-se a P-gp, da superfamília de transportadores ABC, codificada pelo gene *ABCB1* situado no locus 7q2.1.1 do cromossomo 7 humano (GODMAN & GILMAN, 2012). A P-gp está envolvida na resistência a drogas apresentada por células tumorais (D *et al.*, 2000). Estudos “in vitro” com células transformadas detectaram um fenótipo de resistência múltipla a drogas frequentemente associado com expressões exarcebadas de P-gp (SIEGSMUND *et al.*, 2002). Igualmente, evidências indicam que variações na atividade

e expressão da P-gp podem reduzir ou aumentar a biodisponibilidade de fármacos (HOFFMEYER *et al.*, 2000). Pelo seu histórico, o gene *ABCB1* poderia ser um marcador genético humano envolvido na ocorrência de casos de resistência aos fármacos anti-TB. Uma vez que R e E fármacos utilizados para o tratamento da TB, são substratos de P-gp, supõem-se que modificações na atividade/expressão nos transportadores de efluxo poderiam resultar em alterações nas concentrações intracelulares de drogas fazendo com que a dose terapêutica não seja adequada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é o único da família Mycobacteriaceae, compreende mais de 100 espécies e está relacionado a outros gêneros que possuem ácidos micólicos em sua parede celular, como: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordoniae* e *Tsukamurella*. A espécie tipo do gênero é o *Mycobacterium tuberculosis*, identificado por Robert Koch em 1882. Esta espécie juntamente com as espécies *M. bovis* (incluindo *M. bovis* BCG), *M. africanum* e *M. microtti* e as subespécies *M. tuberculosis* subs. *canetti* e *M. tuberculosis* subs. *caprae*, constituem o Complexo *M. tuberculosis*, que são geneticamente próximos apresentando mais de 95% de homologia DNA-DNA. Estudos recentes que analisaram o genoma das diferentes espécies demonstraram que *M. tuberculosis* tem regiões genéticas que foram perdidas nos outros membros do Complexo (COELHO; MARQUES, 2006).

O Complexo *M. tuberculosis* pode ser diferenciado das outras micobactérias pela presença de sequências genéticas IS6110, IS1081 e *mpb 70* e pela ausência de: pigmentação das colônias, crescimento na presença de 500g/ml p-nitrobenzoato, crescimento em concentração de 5% cloreto de sódio, crescimento a 45°C, catalase termoestável e arilsulfatase. Algumas características do *M. tuberculosis* explicam aspectos da história natural da tuberculose, como por exemplo, ser um parasita intracelular facultativo e por isso capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de células fagocitárias e ser resistente à ação de agentes químicos e sensível à ação de agentes físicos como o calor e a radiação ultravioleta, mas não ao congelamento e à dessecação. Tem tempo de geração longo entre 14 a 20 horas podendo entrar em estado de dormência, no qual sobrevivem sem se dividir (reservatório para reativação da

doença). As bactérias do Complexo *M. tuberculosis* têm sua estrutura bacilar apresentando-se como bacilos medindo 0,2 a 0,6mm de diâmetro e 1 a 10mm de comprimento. São imóveis, não esporulados, não capsulados, aeróbios estritos e sua faixa de temperatura ótima de crescimento é 35-37°C. Uma característica importante é o agrupamento dos bacilos formando ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas (a presença de ésteres de trealose - dimicolato de 6,6'-trealose - caracterizam o fator corda). A observação de cordas ao exame microscópico (baciloscopia) é uma indicação de que se trata de bactéria do Complexo *M. tuberculosis*. A morfologia das colônias tem aspecto seco, rugoso, acamurçado, sem produção de pigmento, apresentando-se com coloração creme no crescimento em meio Lowenstein-Jensen (Fig. 1) (PFYFFER, 2015).

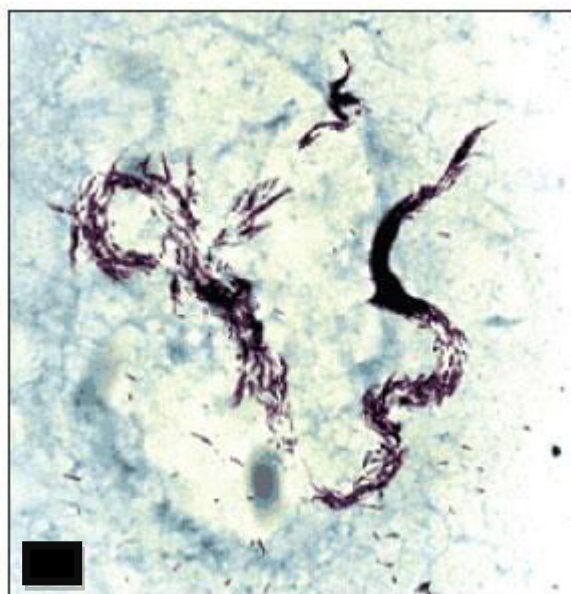


Figura 1. Mycobacterium tuberculosis: coloração de Ziehl-Neelsen evidenciando disposição de crescimento em cadeias paralelas formando cordões (expressão do fator corda).

2.1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que pode acometer vários órgãos e/ou sistemas do corpo humano. A apresentação da TB na forma clínica pulmonar é a mais frequente e importante na disseminada da infecção, pois é essa que quando bacífera é a responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença (SECRETARIA DA SAÚDE).

Anualmente são notificados cerca de 6 milhões de novos casos de TB em todo o mundo, levando mais de um milhão de pessoas a óbito. O surgimento da Síndrome de imunodeficiência adquirida (do inglês *aids*) e o aparecimento de tuberculose resistente aos medicamentos agravam ainda mais esse cenário (PROGRAMA MUNICIPAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE E HANSENÍASE, 2016).

No Brasil, a TB é sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. A cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem 4,6 mil mortes em decorrência da doença. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo (PORTAL DA SAÚDE, 2016). É a doença infecciosa que mais mata no mundo, superando as mortes causadas pela malária e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) juntos. Em 2014 estimou-se em 480 mil casos de TB-MDR (PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE, 2016).

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu comitê técnico assessor, reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil. Com base nos resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos anti-TB, que mostrou aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%) e introduz o etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico.

Portanto, no Brasil, o esquema de tratamento inicial para TB, implantado desde 2009, consiste no uso de rifampicina, isoniazida e pirazinamida e etambutol por dois meses, seguidos de rifampicina e isoziniazida por mais quatro meses (Esquema básico), totalizando seis meses de tratamento (Tabela 1). É indicado para todos os casos de TB pulmonar ou extrapulmonar (exceto meningite) sem tratamento prévio, em terapêutica parcial ou interrompida (menos de 30 dias) ou tratamento há mais de cinco anos, quando o teste do Xpert MTB-RIF não está disponível ou foi negativo para resistência a rifampicina. (SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Tabela 1. Esquema básico para adultos e adolescentes.

Regime	Fármaco	Faixa de peso	Unidades/dose	Duração (meses)
2RHZE Fase intensiva	RHZE	20 a 35 kg	2 comprimidos	2
	150/75/400/275	36 a 50 kg	3 comprimidos	
	comprimido em dose fixa combinada	>50 kg	4 comprimidos	
4RH Fase de manutenção	RH	20 a 35 kg	1 cápsula 300/200	4
	300/200 ou 150/100	36 a 50 kg	1 cáps 300/200 + 1 cáps 150/100	
	cápsula	>50 kg	2 cápsulas 300/200	

Fonte: Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde
R: Rifampicina; H: Isoniazida; Z: Pirazinamida; E: Etambutol

Em pacientes com evolução clínica inicial não satisfatória e TB extrapulmonar, como meningoencefalite, o tempo de tratamento poderá ser prolongado, na sua 2ª fase, por mais três meses, totalizando nove meses. Para todos os casos soropositivos, casos de retratamentos, é solicitada cultura, identificação e teste de sensibilidade, iniciando-se o tratamento com o etambutol, até obter-se o resultado do TSA. (MANUAL DE RECOMENDAÇÕES TB, 2011)

O esquema básico da TB dura no mínimo seis meses e, nesse período o estabelecimento de vínculo entre o profissional de saúde e o paciente é fundamental para que haja adesão ao tratamento e assim reduzir as chances de abandono para se alcançar a cura. Para melhorar a adesão e o resultado terapêutico, o paciente deve ser orientado, de forma clara, quanto às características da tuberculose e do tratamento a que será submetido: medicamentos, duração e regime de tratamento, benefícios do uso regular dos medicamentos, possíveis consequências do uso irregular dos mesmos e eventos adversos (PORTAL DA SAÚDE, 2016). Logo nas primeiras semanas de tratamento o paciente se sente melhor e, por isso, precisa ser orientado pelo profissional de saúde a realizar o tratamento até o final, independente da regressão dos sintomas. É importante lembrar que tratamento irregular pode complicar a doença e resultar no desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos já em uso (PORTAL DA SAÚDE, 2016).

O teste molecular, Xpert MTB-RIF, introduzido na rede pública em 2011, apresenta grau de sensibilidade e de especificidade comparáveis aos testes tradicionais, tendo a vantagem de fornecer resultado mais rápido e com a informação adicional de resistência à rifampicina. (BOEHME *et al.*, 2010), diagnosticando rapidamente a tuberculose resistente ao menos a um fármaco, com grandes chances de ser um caso de TB-MDR. É considerado “caso novo” ou sem tratamento anterior os pacientes que nunca se submeteram à quimioterapia anti-TB ou o fizeram por menos de 30 dias ou há

mais de cinco anos. Por esses critérios é importante verificar insistentemente com o paciente e seus familiares, se não houve tratamento prévio, superior a 30 dias (JR E DA, 2004).

Define-se como retratamento ou com tratamento anterior, pessoa já tratada para TB por mais de 30 dias que necessite de novo tratamento por recidiva após cura ou retorno após abandono. Nestes casos, o paciente que retorna ao sistema após abandono deve ter sua doença confirmada por nova investigação diagnóstica por baciloscopia, devendo ser solicitada cultura, identificação e teste de sensibilidade, antes da reintrodução do tratamento anti-TB básico (JR E DA, 2004).

Considera-se caso de abandono, o doente que após iniciado o tratamento para tuberculose, deixou de comparecer à unidade de saúde por mais de 30 dias consecutivos, após a data apazada para seu retorno (JR E DA, 2004).

Considera-se caso de recidiva, o doente com tuberculose em atividade que já se tratou anteriormente e recebeu alta por cura, desde que a data da cura e a data do diagnóstico de recidiva não ultrapasse cinco anos. Se esse intervalo exceder cinco anos, o caso é considerado como “caso novo” e o tratamento preconizado é o esquema básico (JR E DA, 2004).

Entende-se por falência a persistência da positividade do escarro ao final do tratamento. São também classificados como casos de falência aqueles que, no início do tratamento, são fortemente positivos (++ ou +++) e mantêm essa situação até o quarto mês ou aqueles com positividade inicial seguida de negatificação e nova positividade por dois meses consecutivos, a partir do quarto mês de tratamento (JR E DA, 2004). O aparecimento de poucos bacilos no exame direto do escarro, na altura do 5.º ou 6.º mês, isoladamente, não significa, necessariamente, falência do esquema, em especial se acompanhado de melhora clínico-radiológica. Nesse caso, o paciente será seguido com exames bacteriológicos. (MANUAL DE RECOMENDAÇÕES TB, 2011)

Em 1993, a TB passou a ser reconhecida, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma emergência global. Ela foi inserida nas políticas de saúde internacionais quando foi definida a meta de reduzir e parar o coeficiente de incidência da doença a partir de 1990 até 2015. Essa meta foi contemplada nos oito Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) da Organização das Nações Unidas (ONU). Adicionalmente, a OMS divulgou, em 2006, a Estratégia Stop TB, que visava fortalecer

a Estratégia Directly Observed Treatment ShortCourse (DOTS) e reduzir em 50%, até 2015, os coeficientes de prevalência e de mortalidade por TB em relação ao ano de 1990.

O DOTS foi proposto em 1993, no intuito de atingir 85% de sucesso de tratamento e detectar ao menos 70% dos casos de TB. Esta estratégia é composta por cinco elementos: compromisso dos governos ao suporte financeiro das atividades de controle da TB; detecção de casos por baciloscopia de escarro entre pacientes sintomáticos que se apresentam espontaneamente ao serviço de saúde; suprimento regular de todos os medicamentos essenciais anti-TB; sistema padronizado de registro e notificação que permita conclusões seguras sobre os resultados do tratamento para cada paciente e do controle do programa de forma geral; e por último, regime de tratamento padronizado de seis a oito meses para todos os casos confirmados a partir de baciloscopias, com tratamento supervisionado pelo menos nos dois meses iniciais (VILLA *et al.*, 2008).

Com o tratamento supervisionado o aumento da proporção de cura dos casos de TB com baciloscopia positiva, vem sendo ampliado timidamente no estado do RJ, atingindo 42,6% dos casos em tratamento, em 2012, segundo dados levantados no SINAN, onde a taxa de cura neste ano foi de 65,7%, quando a meta preconizada é de 85%. A proporção de abandono, no ano de 2012, atingiu 13,8%, quando a meta preconizada é de, no máximo, 5%. (BOLETIM TUBERCULOSE, 2014). Todos esses fatores levaram a uma baixa taxa de cura e representam um grande desafio para o controle da doença.

A partir das estratégias expostas, o panorama mundial da TB se modificou. O diagnóstico eficaz e o tratamento da doença salvaram, no mundo, 43 milhões de vidas no período de 2000 a 2014 e, em 2015, a prevalência estimada de tuberculose foi 42% menor do que em 1990. Apesar disso, a doença ainda se configura como uma emergência global: estima-se que, em 2014, 9,6 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose, das quais 12% eram HIV-positiva. Houve ainda a morte de 1,5 milhão de pessoas, sendo que 1,1 milhão eram HIV-negativa (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

O sucesso do tratamento da TB leva a redução da transmissão da doença e, portanto, o sucesso no tratamento é fundamental para o controle da doença. A

identificação de fatores que possam interferir com esse sucesso é de grande utilidade na melhoria de desfechos (AMANTE E AHMED, 2015).

2.1.2 Resistência ao tratamento da TB

A incidência de casos de TB com resistência bacilar, por pressão seletiva de um ou mais medicamentos anti-TB, tem sido relatada desde a introdução das primeiras quimioterapias, na década de 40. A emergência das formas multirresistentes seguiu-se ao uso amplo da rifampicina a partir da década de 70, somando-se a resistência a isoniazida (TB-MDR) (ROCHA *et al.* 2008). O número de casos confirmados de TBMR no Brasil notificados a OMS foi de 8,9 mil sendo 1,4 mil casos novos e 7,5 mil casos de retratamento (OMS, 2015).

Os países que conquistaram um efetivo controle da TB, com base no desenvolvimento social e ampla cobertura quimioterápica, selecionaram cepas do *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à estreptomicina e isoniazida, os dois dos principais medicamentos utilizados nos esquemas terapêuticos na década de 60, antes da incorporação da rifampicina. A maior expectativa de vida, aliada à imunodepressão, favoreceu a reativação da TB entre os idosos infectados, com bacilos resistentes à estreptomicina e isoniazida. Tal fato possibilitou o surgimento de cepas resistentes à dupla rifampicina e isoniazida, na década de 80 quando a rifampicina passou a compor o esquema de tratamento. Desse modo, a TB-MDR, nos países desenvolvidos, caracteriza-se por ser basicamente primária, com transmissão institucional, mais frequente em pacientes infectados pelo HIV, além de casos oriundos de outros países pelos movimentos migratórios (ROCHA *et al.*, 2008).

A resistência aos esquemas terapêuticos propostos vem se tornando cada vez mais frequente, representando a maior ameaça à efetividade do controle da TB. Isso torna o tratamento mais longo e conseqüentemente mais dispendioso, trazendo efeitos secundários mais intensos ao paciente. Para todos os casos de retratamentos é solicitada cultura, identificação e teste de sensibilidade, iniciando-se o tratamento com o Esquema básico, até obter-se o resultado desses exames (MANUAL DE RECOMENDAÇÕES TB, 2011) (Tabela 2).

No Brasil, utiliza-se a classificação da TBMR de acordo com o tipo de resistência bacilar, quando é no mínimo resistente a rifampicina e isoniazida. Assim, essa doença pode ser considerada primária ou inicial - quando o doente é contaminado

por bacilos multirresistentes; ou pode ser adquirida ou pós-primária, situação em que os sujeitos já passaram por tratamento para TB por pelo menos trinta dias (MANUAL DE RECOMENDAÇÕES TB, 2011).

Em casos mais graves, o bacilo pode apresentar resistência às fluoroquinolonas e também às drogas injetáveis de segunda linha (estreptomicina, canamicina e amicacina), configurando a denominada tuberculose extensivamente resistente ou XDRTB (do inglês, Extensively Drug-Resistant Tuberculosis), que em 2011 tiveram seus primeiros casos na Bahia (MANUAL DE RECOMENDAÇÕES TB, 2011).

No Brasil, a maior parte dos casos de TBMR é pós-primária ou adquirida, não relacionada a coinfeccção por HIV ou a surtos institucionais, parece ser o resultado da irregularidade e do abandono do tratamento. Ressalta-se que os regimes terapêuticos são ambulatoriais e, até o final da década de 90, quase totalmente auto-administrados (ROCHA *et al.*, 2008).

A resistência às drogas antituberculose pode ser resultado do uso impróprio dos antibióticos empregados e está relacionada com diversos fatores, entre eles: a administração de regimes de tratamento inadequados (prescrições inadequadas, uso incorreto e irregularidade na composição das medicações), a falta de adesão do doente ao tratamento, absorção intestinal deficiente, falta de suspeita pelo médico de resistência primária devido a falhas no seguimento dos casos sensíveis ou falta ou falha na provisão e distribuição dos medicamentos padronizados (BALLESTERO *et al.*, 2014).

REGIME	DROGAS	DOSES POR PESO				MESES
		Até 20kg	21kg a 35kg	36kg a 50kg	> 50kg	
2SSELZT Fase Intensiva 1ª etapa	Estreptomicina	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	1000mg/dia	2
	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia - 800mg/dia	800mg/dia - 1200mg	1200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia - 500mg/dia	500mg/dia - 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1000mg/dia	1500mg/dia	1500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	
4S3ELZT Fase Intensiva 2ª etapa	Estreptomicina	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	1000mg/dia	4
	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia - 800mg/dia	800mg/dia - 1200mg	1200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia - 500mg/dia	500mg/dia - 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1000mg/dia	1500mg/dia	1500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	
12 ELT Fase de Manutenção	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia - 800mg/dia	800mg/dia - 1200mg/dia	1200mg/dia	12
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia - 500mg/dia	500mg/dia - 750mg/dia	750mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	

Tabela 2. Esquema de tratamento para TBMR segundo o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose – Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 2011.

Estudos realizados entre 2002 e 2006, os quais envolveram 90.000 pacientes em 81 países, demonstraram um aumento da prevalência estimada de tuberculose resistente (DR-TB, do inglês *drugresistant-tuberculosis*). Em 2005, ocorreram 500.000 casos novos de TBMR no mundo, correspondendo a 5% do número total de casos de tuberculose. No mesmo ano, a prevalência de TBMR primária foi de 2,9% (variação, 2,2-3,6%), enquanto a de TBMR adquirida foi de 15,3% (variação, 9,6-21,1%), respectivamente. Em 1996, foi realizado no Brasil o I Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Antituberculose. Os participantes foram recrutados em 13 unidades de saúde de todo o país, e aproximadamente 6.000 cepas de MTB foram identificadas. As taxas de prevalência de TBMR primária e adquirida foram de 1,1% e 7,9%, respectivamente. No Sul do Brasil, as taxas de prevalência de TBMR primária e adquirida (0,8% e 5,8%, respectivamente) foram menores do que a prevalência nacional (MICHELETTI *et al.*, 2014).

Em 2009, resultados preliminares do segundo inquérito de resistência aos medicamentos anti-TB evidenciaram o aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6%). A partir disso, o país incorporou o etambutol no esquema básico de tratamento da tuberculose, qualificaram profissionais e iniciou a oferta dos medicamentos em dose fixa combinada. As novas formulações permitiram uma redução na quantidade de comprimidos a ser ingerido diariamente, o que contribuiu para a adesão ao tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Avaliando-se os resultados de tratamento para os casos novos de tuberculose multirresistente diagnosticados em 2012, observa-se que 58% curaram ou completaram o tratamento, 6,3% apresentaram falência ao tratamento, 17,7% abandonaram, 10,6% foram a óbito, 6,1% ainda estão em tratamento e 1,2% tiveram outros encerramentos. O elevado número de óbitos e de abandonos evidencia que é complexo o manejo clínico desses casos e que ainda são grandes os desafios para o controle da tuberculose resistente no país (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2014).

Em 2013, foram notificados e acompanhados no SITE-TB os seguintes casos: 148 casos novos de monorresistência; 50 de polirresistência 525 de multirresistência; 21 de resistência extensiva; 211 de micobacterioses não tuberculosas (MNT), além de 878 casos com indicação de uso de esquemas especiais em decorrência de hepatopatias, intolerância grave, alergia medicamentosa, comorbidades, falência ao esquema básico, entre outros (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2014).

O Estado do Rio de Janeiro é o que apresenta o maior registro de casos de tuberculose multirresistente no Brasil, concentrando cerca de 1/4 dos casos, no ano de 2011. (SECRETARIA DE SAÚDE, 2011)

Num estudo em Porto Alegre em 2014, a resistência a pelo menos um fármaco antituberculose e TBMDR foram observadas em 14,0% e 4,7% dos pacientes, respectivamente. A resistência foi oito vezes maior nos pacientes com história de tuberculose. Monorresistência à isoniazida foi mais frequente do que monorresistência à rifampicina. As taxas de prevalência de TBMDR primária e adquirida foram de 2,2% e 12,0%, respectivamente (MICHELETTI *et al.*, 2014). Sugerindo-se que o fenômeno de TBMDR seja gerado, basicamente, por tratamentos anteriores irregulares (OMS, 2010, TBMR – GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011). Porém, sabe-se que a questão é mais ampla e complexa, uma vez que pacientes tratados com as mais diversas drogas apresentam variabilidade de resposta e de susceptibilidade à toxicidade

medicamentosa (METZGER; SOUZA-COSTA; TANUS-SANTOS, 2006) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Dentre as causas de variação na resposta individual à mesma posologia de um fármaco podem-se destacar a idade, os fatores genéticos e imunológicos, as enfermidades e a ocorrência de interações entre princípios ativos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A variabilidade genética pode alterar tanto a farmacodinâmica, ou seja, a relação entre a dose administrada e os efeitos produzidos, como a farmacocinética, que relaciona os eventos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da substância à sua concentração sistêmica (WEINSHILBOUM E WANG, 2006).

2.2 Transportadores de Membrana

As membranas celulares possuem uma camada lipídica dupla, que serve como barreira para a maioria das moléculas polares. São duas camadas de fosfolípeos com os grupamentos apolares (hidrofóbicos) voltados para dentro e os grupamentos polares (hidrofílicos) voltados para fora. Inseridas na membrana, estão moléculas proteicas que mantêm a constância do meio intracelular, em equilíbrio com o meio extracelular. Dentre estas proteínas presentes na membrana plasmática estão os transportadores transmembrana que estão na estrutura da membrana celular, envolvendo as porções extra, trans e intracelular (Figura2) (ALBERTS *et al.*, 2010).

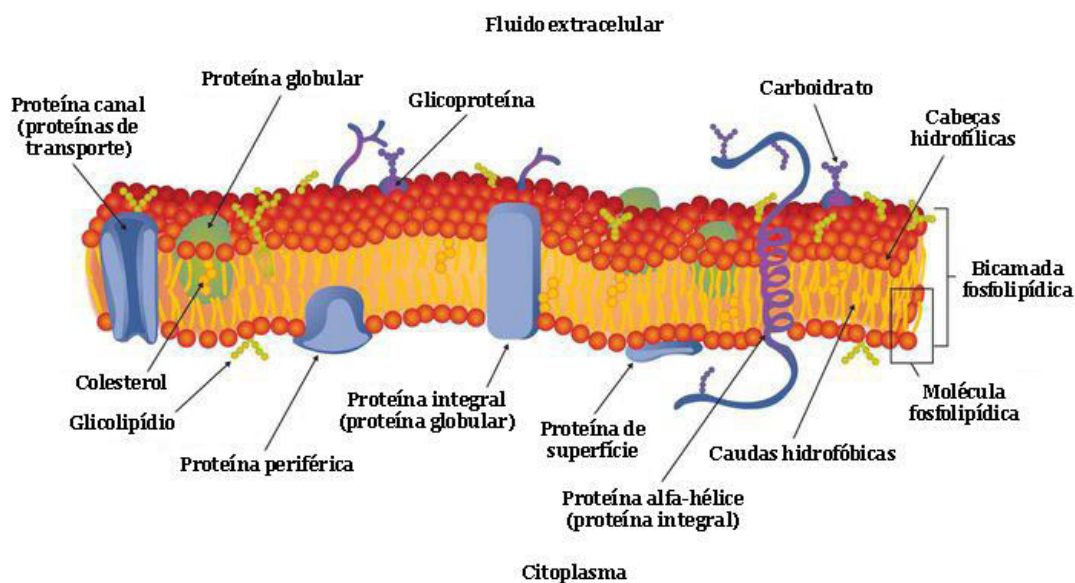


Figura2- Membrana Plasmática com transportadores transmembrana.

Fonte: <http://biologiaecia.com.br/envoltorios-celulares/>

As proteínas de transporte de membrana são responsáveis pela passagem de diversas moléculas polares através da membrana plasmática, entre eles, íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e metabólitos celulares. Para que o transporte ocorra, a proteína requer energia e então sofre mudanças conformacionais que possibilitam a chegada da molécula do outro lado da membrana. Existe uma especificidade demonstrada na década de 50 entre as moléculas e as proteínas que as transportam (ALBERTS *et al.*, 2010).

Embora muitos fármacos sejam lipofílicos o suficiente para atravessar passivamente as membranas celulares, sabe-se, que muitos fármacos também precisam ser transportados ativamente para o interior das células. Esse fato possui consequências significativas para a biodisponibilidade oral (transporte nos enterócitos ou excreção ativa na luz intestinal), para o metabolismo hepático (transporte nos hepatócitos para metabolismo enzimático e excreção na bile) e para a depuração renal (transporte nas células tubulares proximais e excreção na luz tubular). Esses processos são mediados por diversas moléculas importantes (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

2.2.1 Família de transportadores ABC

Os transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*) são uma das maiores famílias de proteínas, e estão presentes em todos os organismos vivos, desde bactérias até seres humanos. A característica mais marcante é a sequência de 215 aminoácidos altamente conservada. Os membros desta família são proteínas transmembrana (proteínas que atravessam a membrana celular, possuindo uma porção no interior da célula e outra no exterior) capazes de realizar o influxo e efluxo de substratos através da membrana celular, com gasto de energia. (GLAVINAS *et al.*, 2004)

Essa família de proteínas possuem dois sítios de ligação de ATP onde os transportadores se ligam e/ou hidrolisam moléculas de ATP, obtendo desta forma a energia necessária para bombear compostos específicos para fora da célula, mesmo contra o gradiente de concentração. (DEAN, 2009)

A estrutura básica que define os membros desta família de proteínas é a combinação de domínios de ligação ATP conservados e transmembranares. Em mamíferos, as proteínas ABC funcionalmente ativas consistem em quatro domínios característicos: dois domínios transmembranares (TMD) e dois domínios de ligação a

nucleotídeos (NBDs). Estes quatro domínios podem estar presentes dentro de uma cadeia polipeptídica (transportadores cheios), ou dentro de duas proteínas separadas (meio transportadores). (Figura 3). Neste último caso, os transportadores ABC tornam-se funcionalmente competentes após dimerização específica os domínios que abrangem a membrana formam o fundo estrutural chave da função dos transportadores ABC. As duas TMDs contêm cadeias polipeptídicas que atravessam a membrana várias vezes, formando tipicamente seis hélices transmembranares por domínio, um total de doze hélices num transportador completo (GLAVINAS *et al.*, 2004).

As 12 hélices transmembranares provavelmente formam uma estrutura semelhante a poros através da membrana, e através deste caminho uma gama de diferentes substratos, podem ser transportados por estas proteínas. Acredita-se que as alterações conformacionais dentro dos domínios TMD sejam responsáveis pelos estados aberto ou fechado destas estruturas transmembranares. (GLAVINAS *et al.*, 2004)

Um grande número de genes codifica proteínas transportadoras e algumas doenças humanas hereditárias ocorrem devido a mutações que afetam o transporte celular, o que reforça a importância do assunto (ALBERTS *et al.*, 2010).

Diversos transportadores de membrana que fazem o efluxo de drogas já foram descritos, porém a Glicoproteína-P (P-gp), é uma das mais bem caracterizadas até o momento. (AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004)

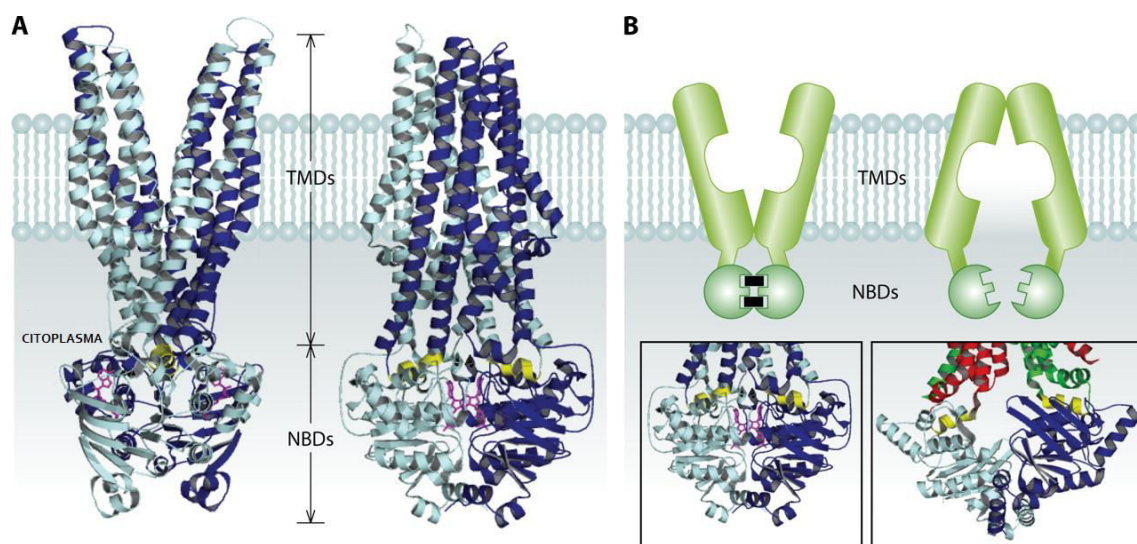


Figura 3. Modelo de Transportador ABC. (CUTHBERTSON; KOS; WHITFIELD, 2010)

3 GENE *ABCB1* (*MDR1*)

Mecanismos das células conferem resistência a várias drogas, conhecidos como resistência a múltiplas drogas (MDR) (GOTTESMAN E PASTAN, 1993). O fenótipo MDR é caracterizado como a capacidade das células resistirem à citotoxicidade de drogas, sendo considerado o principal mecanismo de insucesso no tratamento de tumores (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Em seres humanos, ocorrem dois subtipos de genes da família MDR, denominados MDR1 e MDR2, sendo que apenas o MDR1 confere o fenótipo de resistência. Na década de 80, o gene MDR1 foi mapeado na região do braço longo do cromossomo 7 (7q21.12) do genoma humano (NG *et al.*, 1989). (GenBank accession number: NT_007933)

Em 2000, Hoffmeyer *et al.* descreveram 15 SNPs para o gene *ABCB1* e hoje são conhecidos pelo menos 1279 SNPs neste gene, sendo 50 deles na região codificadora (FUNG E GOTTESMAN, 2009). Destes polimorfismos descritos, três tem sido especialmente estudados, sendo dois silenciosos c.1236C>T, c.3435C>T que não envolve a mudança de aminoácido porém pode influenciar na estabilidade do RNA mensageiro e na afinidade do substrato. E um polimorfismo que resultam duas distintas mudanças de aminoácido c.2677G>T/A (Ala893Ser/Thr). Entre os polimorfismos descritos o que está localizado no exon 21 (c.2677G>T) e no exon 26 (c.3435C>T) são frequentemente analisados em estudos farmacogenéticos e populacionais devido a sua correlação com a mudança de níveis de expressão e atividade da P-gp (HOFFMEYER *et al.*, 2000). (Figura 8) A associação entre os genótipos dos polimorfismos *ABCB1* resultou em 18 possíveis haplótipos, 10 dos quais foram encontrados nos indivíduos brasileiros de ascendência europeia. Os haplótipos mais encontrados foram 2677GT/3435CT (36.2%), seguido de GG/CC (15.9%), GG/CT (11.5%) e TT/TT (10.1%), enquanto que a frequência GT/TT (7.3%), GT/CC (7.2%), GA/CC (4.4%), GG/TT e TA/CT (2.9%), e TT/CT (1.5%) foram menores (RODRIGUES *et al.*, 2005). Indivíduos em homozigose para o alelo T em ambos os alelos apresentam menor expressão e atividade da P-gp do que indivíduos com outros genótipos (EICHELBAUM; INGELMAN-SUNDBERG; EVANS, 2006)

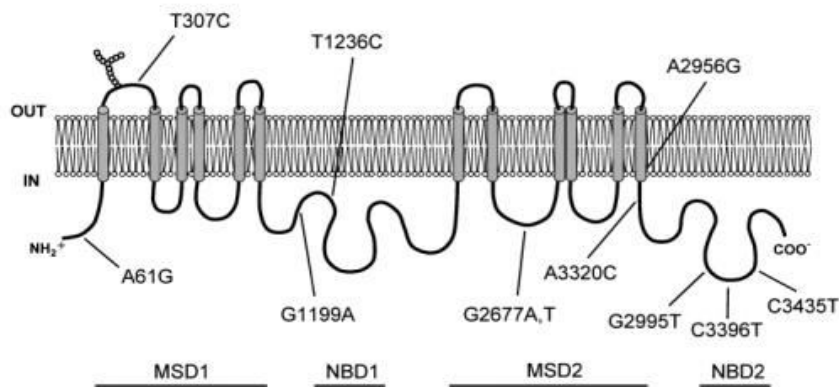


Figura 9. Localização dos polimorfismos no gene *ABCB1*

Estudos demonstraram que existe uma relação de desequilíbrio de ligação entre os SNPs no exon 26 (3435C>T) e no exon 21 (2677G>T/A), sugerindo que diferenças funcionais observadas na P-gp, inicialmente atribuídas ao SNP no exon 26 (sinônimo), poderiam ser um resultado de uma associação com o polimorfismo no exon 21 (não-sinônimo) (KIM *et al.*, 2001). Três combinações comuns de haplótipos, encontradas em mais de 70% dos indivíduos, foram relatadas em vários estudos, e parecem ser observadas em todos os grupos étnicos com um forte desequilíbrio de ligação entre os exons 26 e 21. Também tem sido demonstrado que um SNP sinônimo no exon 12 (1236C>T) está ligado aos exons 26 (3435C>T) e 21 (2677G>T/A). Da mesma forma, quando possíveis combinações genóticas dos polimorfismos nos exons 26, 21 e 12 do MDR1 foram analisados, em mais de 50% dos indivíduos estudados pareceu existir um forte desequilíbrio de ligação (KIM *et al.*, 2001).

3.1 Relevância da Farmacogenética: Impacto do polimorfismo do gene *ABCB1* (*MDR1*)

A farmacogenética consiste no estudo das variações no *DNA* humano relacionadas com a toxicidade, eficácia e resposta a fármacos com a proposta de objetiva de aperfeiçoar o tratamento através da personalização terapêutica conforme as diferenças nas características genéticas individuais, de maneira a reduzir os efeitos adversos e aumentar a eficácia da resposta aos medicamentos (HUGHES, 1999; BARROS, 2008)

Devido a necessidade de elucidação das diferenças interindividuais para melhorar a resposta medicamentosa, os estudos da farmacogenética vem crescendo a cada dia. Entretanto além dos fatores genéticos, uma grande variedade de fatores contribui para essas diferentes respostas, desde interação entre drogas, fatores ambientais, idade, imunológicos, comorbidades e enzimas que estão envolvidas com transporte e metabolismo dos fármacos (LEE *et al.*, 2005; RANG *et al.*, 2015).

A variabilidade genética pode alterar tanto a farmacodinâmica, ou seja, a relação entre a dose administrada e os efeitos produzidos, como a farmacocinética, que relaciona os eventos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da substância à sua concentração sistêmica. (WEINSHILBOUM E WANG, 2006)

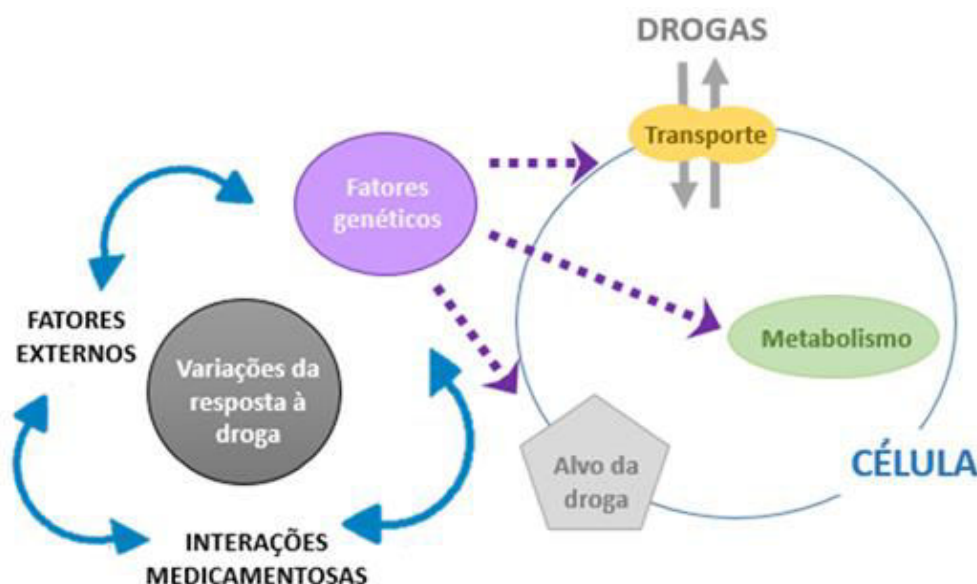


Figura 7. Representação dos fatores envolvidos com as diferentes formas interindividuais de resposta a drogas. Adaptado de: Lee *et al.*, 2005

O primeiro marco histórico relativo à farmacogenética foi em 510 AC por Pitágoras que descreveu a ocorrência de intoxicação aguda em indivíduos que ingeriram fava, que posteriormente foi caracterizada pela deficiência de Glicose-6-fostato desidrogenase (G6PD). Em 1906, Archibald Garrod havia afirmado que variações genéticas, por sua vez, podiam causar reações biológicas negativas com determinadas substâncias químicas. Ele também alegou que as enzimas são responsáveis pela

desintoxicação de substâncias estranhas, e as pessoas com falta destas enzimas necessárias não são capazes de eliminá-las do corpo (PIRMOHAMED, 2001).

O primeiro estudo farmacogenético foi conduzido em 1932, quando a incapacidade para saborear um composto químico conhecido como feniltiocarbamida foi visto em conexão com um traço autossômico recessivo. Neste estudo, os indivíduos com dois alelos recessivos não poderiam produzir a enzima que lhes permitiu o gosto feniltiocarbamida químicos. A dedução demonstra como algumas substâncias químicas reagem de maneira diferente devido a predisposições genéticas (PIRMOHAMED, 2001).

Nas décadas de 1940 e 1950, respostas variáveis de drogas em pessoas que tomam diversos medicamentos preventivos foram notadas pela primeira vez. Durante a segunda Guerra Mundial, alguns soldados começaram a mostrar sintomas de anemia após receber doses de uma droga anti-malária chamada primaquina. Estudos posteriores demonstraram que a anemia foi provocada por uma deficiência genética da G6PD. Do mesmo modo, alguns pacientes foram observados, e verificou-se que a deficiência de certas enzimas levou à incapacidade de metabolizar essas drogas. Depois de estudar estes casos, em 1957, Moltulsky percebeu que os traços herdados não só poderiam contribuir para provocar reações adversas, mas também determinar se os medicamentos são realmente eficazes ou não.

Price Evans *et al.*, (1960) relataram a associação entre polimorfismos da enzima N-acetiltransferase (*NAT*), metabolização e toxicidade da isoniazida, usada no tratamento da tuberculose. Em 1962, Werner Kalow, da Universidade de Toronto, identifica as alterações genéticas responsáveis pela apnéia prolongada, interrupção respiratória, provocada em alguns pacientes tratados com o relaxante muscular succinilcolina (PIRMOHAMED, 2001).

Juntamente com a conclusão do primeiro rascunho do genoma humano em 2000 (Consórcio Internacional do genoma humano), Sachidanandam *et al.*, completaram um mapa de variação de sequência do genoma humano contendo 1,42 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (PIRMOHAMED, 2001). Variações na sequência de DNA ocorrem na população geral de forma estável, sendo encontradas com frequência de 1% ou superior, são denominados polimorfismos genéticos. As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são deleções, mutações e substituições de base única, ou variações no número de sequencias repetidas (VNTR), micro e

minissatélites. O genoma humano possui cerca de 30.000 genes, com um total de 3,12 bilhões de nucleotídeos que apresentam mais de 2 milhões de polimorfismos ocorrendo na frequência de 1 para cada 1.250 pb (METZGER; SOUZA-COSTA; TANUS-SANTOS, 2006).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (Figura 7) (PNUs ou SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) são variações que ocorrem naturalmente em qualquer grupo populacional e muitos deles não causam efeito nenhum. Porém, alguns afetam a expressão e função de proteínas, resultando em fenótipos susceptíveis a doenças e com resposta diferenciada aos medicamentos, como a resistência medicamentosa (FONTANA *et al.*, 2006).

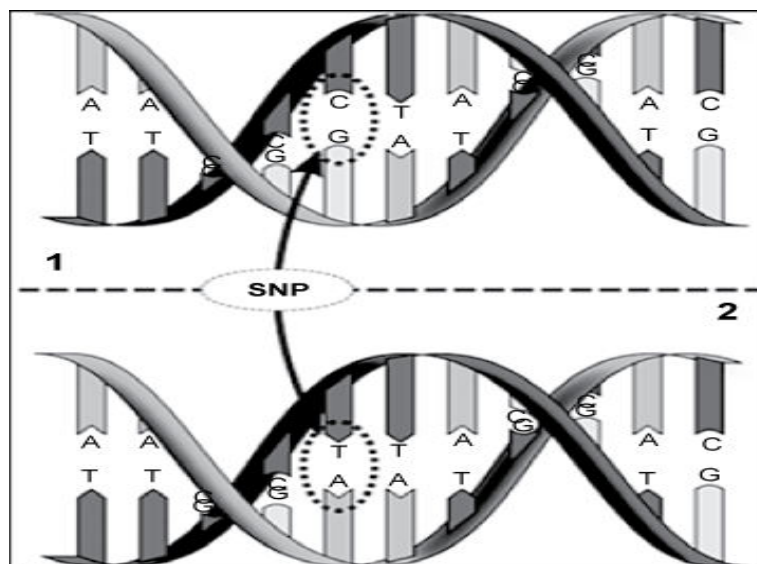


Figura 8. Representação esquemática de um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP). (GIANELLA, 2008)

Uma das primeiras descrições sobre a resistência a múltiplas drogas foi realizada em linhagens celulares de tecidos normais de hamsters, que quando submetidas a doses crescentes de quimioterápicos, tornaram-se resistentes não somente às elevadas doses do quimioterápico, mas também a outros quimioterápicos que não apresentavam semelhança na estrutura química e no mecanismo de citotoxicidade (BIEDLER E RIEHM, 1970).

Posteriormente, outro estudo (DANØ, 1973) utilizando linhagens de células tumorais, caracterizou o fenótipo MDR como resultante da atividade de transporte de drogas para fora das células, dependente de energia e contra o gradiente de concentração. Essas conclusões foram obtidas a partir de observações do acúmulo de

quimioterápicos em linhagens resistentes. No final da década de 70, pesquisadores utilizaram-se das várias linhagens de células de ovário de hamsters, com diferentes graus de resistência a múltiplas drogas e foi identificada nestas linhagens uma glicoproteína que estava ausente na linhagem ancestral (JULIANO E LING, 1976).

3.2 Glicoproteína-P (P-gp)

A P-gp consiste em um transportador de membrana ATPase, que possui cerca de 1280 aminoácidos e tem massa aproximada de 170 kDa (AH, 1998). É expressa como uma cadeia que contém duas regiões homólogas, cada uma contendo 6 α -hélices, estando ligadas ao ATP por um ligante flexível polipeptídico. Atua na como barreira fisiológica uma vez que expulsa toxinas e xenobióticos para o exterior das células (SHAROM, 1997). Destaca-se por ser o transportador mais estudado e mais conhecido desta superfamília de transportadores ABC (SHAROM, 1997).

Muitos dos compostos que interagem com a P-gp são relativamente hidrofóbicos e portanto, conseguem atravessar a membrana citoplasmática das células por difusão passiva (SHAROM, 2011). Apesar de ainda não estar completamente esclarecida a estrutura tridimensional da P-gp foram propostos três modelos que pretendem clarificar o mecanismo de transporte de xenobióticos mediados pela mesma.

No modelo poro membranar a P-gp funciona como um canal, capturando moléculas do interior celular e enviando-as para o exterior. O modelo aspirador hidrofóbico implica na remoção ativa da molécula a partir da face interna da membrana celular, transportando-a para o exterior celular. Este modelo pressupõe que o transportador consiga interceptar substratos antes deles terem a oportunidade de entrar no citosol, protegendo a célula da exposição a possíveis moléculas tóxicas (SHAROM, 2011). Segundo este mecanismo, ocorre a formação de um gradiente de concentração do substrato ao longo da membrana plasmática, com um aumento da concentração do mesmo na fase aquosa externa (SHAROM, 2011). O modelo flipase é semelhante ao aspirador hidrofóbico. Este modelo defende que os substratos são transportados a partir da camada interna da membrana citoplasmática para a camada externa da membrana ou diretamente para o ambiente extracelular. De acordo com este modelo é necessário um pequeno movimento espontâneo dos substratos entre as duas camadas da membrana (SILVA *et al.*, 2015) Devido ao rápido equilíbrio de compartimentação envolvido,

torna-se difícil distinguir entre a atividade “flipase” e o transporte direto do fármaco da membrana para a fase extracelular aquosa (SHAROM, 2011). (Figura 4)

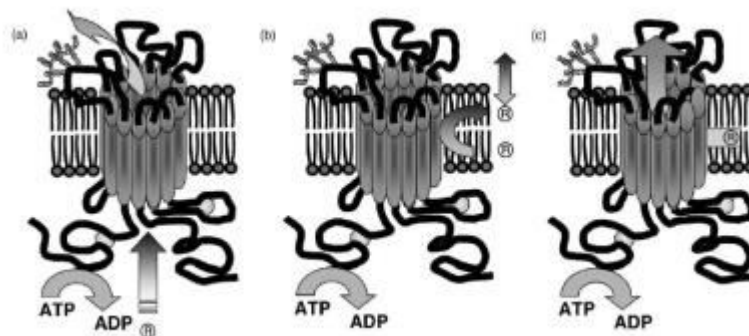


Figura 4. Modelos propostos para o mecanismo de efluxo de fármacos pela P-gp. (a) modelo de poro membranar, (b) modelo flipase, (c) modelo de aspirador hidrofóbico. (adaptado de Varma *et al.*, 2003)

A P-gp é expressa seletivamente no ponto de entrada dos xenobióticos nos tecidos, encontrando-se maioritariamente nas células epiteliais que têm um papel na excreção, incluindo a superfície apical das células epiteliais que revestem o cólon, o intestino delgado (membrana luminal), hepatócitos (membrana apical), ductos pancreáticos, ductos biliares, epitélio dos túbulos proximais dos rins (membrana apical) e glândula adrenal. Deste modo, a P-gp contribui para a expulsão de muitos fármacos dos hepatócitos e túbulos renais para o espaço luminal adjacente, conseguindo reduzir potencialmente a biodisponibilidade de várias moléculas (AMIN, 2013; VARMA *et al.*, 2003).

É nas células epiteliais colunares do trato gastrointestinal inferior que se encontra a maior fração de P-gp no organismo, estando correlacionada com a excreção de fármaco para interior do lúmen do trato gastrointestinal, representando a via mais relevante na detoxificação (THIEBAUT *et al.*, 1987). Também se localiza nas células endoteliais da barreira hematoencefálica (AMIN, 2013). A este nível a P-gp exerce uma ação protetora e auxilia no transporte de substâncias por via transepitelial ou transendotelial, dos capilares dos vasos sanguíneos da barreira hematoencefálica (YU, 1999).

A P-gp encontra-se ainda presente ao nível da placenta, onde desempenha um papel importante na proteção fetal relativamente à toxicidade exercida por moléculas endógenas e/ou exógenas (SHAROM, 1997). A presença da glicoproteína na glândula

adrenal, no endométrio do útero da grávida assim como na placenta, indica um potencial envolvimento no transporte de esteroides, libertando ou protegendo as membranas de efeitos tóxicos provenientes de esteroides dissolvidos. A progesterona assim como outros esteroides têm demonstrado a capacidade de interação com a P-gp (YU, 1999).

A P-gp é também expressa por uma variedade de células imunitárias como monócitos, células T e B. Está envolvida no efluxo de moléculas inflamatórias tais como esteroides, prostaglandinas e citocinas (FRANK *et al.*, 2001). A superexpressão desta proteína ocorre na superfície de muitas células neoplásicas e restringe a entrada de vários antineoplásicos nas células tumorais, sendo por este fato também conhecida como *MDR1* resistência a múltiplos fármacos, dado que tem sido associada a fenómenos de multirresistência de determinadas células cancerígenas, onde os níveis elevados de P-gp originam um aumento do efluxo dos quimioterápicos e, desta forma, diminuem o seu efeito (AMBUDKAR *et al.*, 1999).

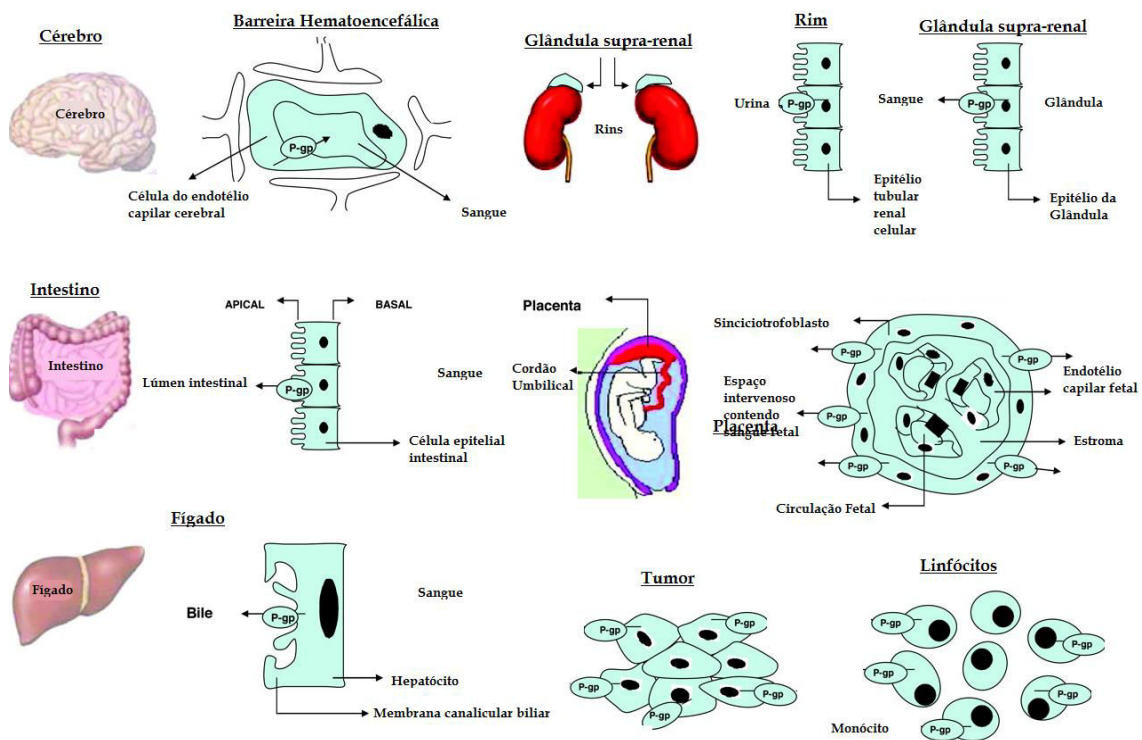


Figura 5. Distribuição da P-gp no organismo humano (“Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein)”, [s.d.] (Adaptado de MARCHETTI e colab., 2007).

Devido à sua localização anatômica a P-gp pode desempenhar várias diferentes funções: limitar a entrada de fármacos no organismo após administração oral como consequência da expressão de P-gp na membrana apical do enterócito, promover a

eliminação de fármacos através da bÍlis e da urina, consequência da expressão de P-gp na membrana canicular dos hepatÓcitos e na porção luminal da membrana das células dos tÓbulos proximais dos rins, limitar a penetraçÓo de fármacos em tecidos sensÍveis, tais como, o cÓrebro, testÍculos, linfÓcitos e limitar a circulaçÓo fetal de xenobiÓticos. A P-gp pode assim ser determinante no sucesso da terapêutica farmacolÓgica uma vez que as concentraçÓes de fármaco intracelular têm que ser as adequadas para que haja a efetividade terapêutica requerida (FROMM, 2004).

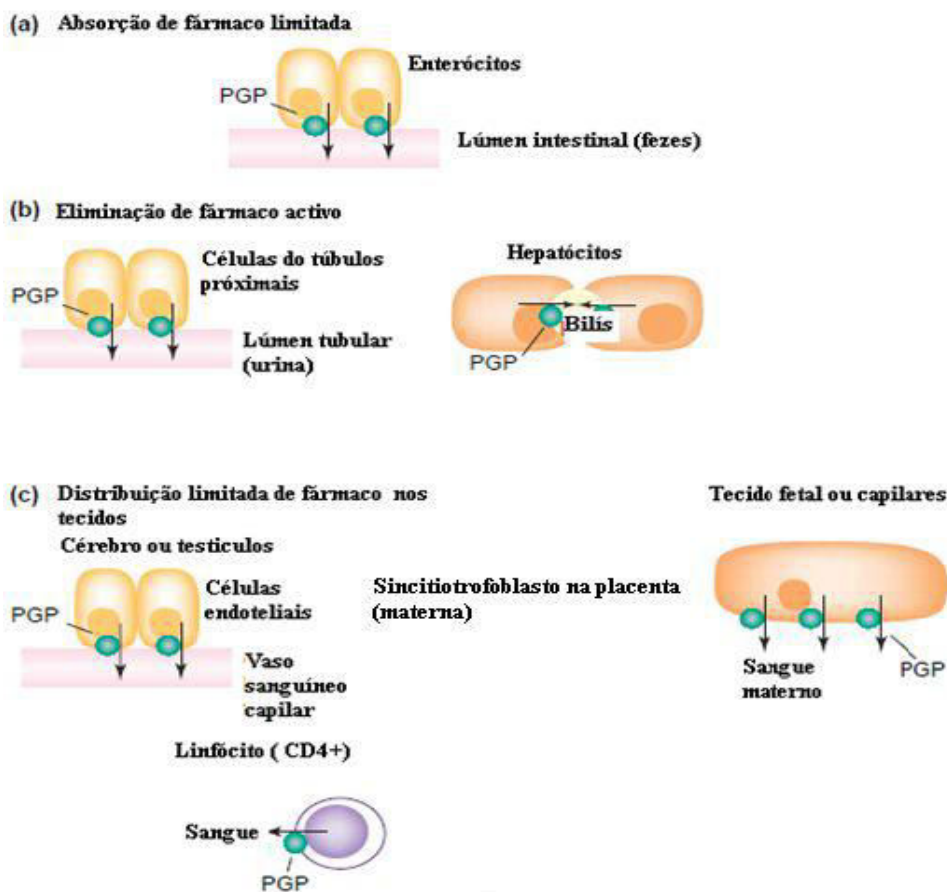


Figura 6. FunçÓo da gp-P em diferentes tecidos (FROMM, 2004).

3.2.1 InteraçÓes farmacolÓgicas mediadas por P-gp.

Fármacos de diversas classes químicas sÓo substratos para a P-gp (AMBUDKAR; KIM; SAUNA, 2006) (Quadro1). Através do conhecimento de drogas que sÓo substratos e/ou inibidores é possÍvel interferir na açÓo da glicoproteÍna, aumentando ou diminuindo a concentraçÓo de fármacos intracelular. (LESPINE *et al.*, 2008)

QUADRO 1
Substratos e inibidores da P-gp (Retirado de TAKANO e col., 2006)(25)
<p>Substratos: Acetobutol, Actinomicina D, ?-Acetilidigoxina, Amitriptilina, Amprenavir, Aparafant, Asimadolina, Atenolol, Atorvastatina, Azilopidina, Azidoprocaína, Azitromicina, Benzopirano, Betametasona, Bisantreno, Bromocriptina, Bunitrolol, Calceína, Camptotecina, Carbamazepina, Carvedilol, Celiprolol, Cefarantina, Cerivastatina, Cloroquina, Clorpromazina, Clorotiazida, Claritromicina, Colchicina, Corticosterona, Cortisol, Ciclosporina A, Daunorubicina, Debrisoquina, Desoxicorticosterone, Dexametasona, Digitoxina, Digoxina, Diltiazem, Dipiridamol, Docetaxel, Dolastatina 10, Domperidona, Doxorubicina, Eletriptano, Emetina, Endosulfano, Eritromicina, Etoposídeo, Fexofenadina, Grepafloxacino, Hidroxirubicina, Imatinibe, Indinavir, Ivermectina, Levofloxacino, Loperamida, Losartana, Lovastatina, Metadona, Metotrexato, Metilprednisolona, Metoprolol, Mitoxantrona, Monensina, Morfina, Nadolol, Nelfinavir, Nicardipina, Nifedipina, Nitrendipina, Norverapamil, Olanzapina, Omeprazol, Valspodar, Paracetamol, Perfenazina, Prazosina, Prednisona, Pristinamicina IA, Puromicina, Quetiapina, Quinidina, Quinina, Ranitidina, Reserpina, Rodamina 123, Risperidona, Ritonavir, Roxitromicina, Saquinavir, Sirolimus, Sumatriptana, Tacrolimos, Talinolol, Tamoxifeno, Taxol, Telitromicina, Terfenadina, Timolol, Toremifena, Tributimetilamônio, Trimetoprima, Valinomicina, Vecurônio, Verapamil, Vimblastina, Vincristina, Vindolina, Vinorelbina.</p> <p>Inibidores: Amiodarona, Amitriptilina, Anlodipino, Astemizol, Atorvastatina, Aureobasidina A, Azelastina, Barnidipina, Benidipina, Bepridil, Bergapteno, Bergapto, Blocanina A, Bircodar, Bromocriptina, Buspirona, Cafeína, Carvedilol, Celiprolol, Cefarantina, Cetoconazol, Cloririfos, Colesterol, Cimetidina, Claritromicina, Clofazimina, Clomipramina, Clotrimazol, Colchicina, Cortisol, Cremofor EL, Ciclosporina, Citochalsina E, Daunorubicina, Desetilamiodarona, Desipramina, Desloratadina, Desmetilazelastina, Dexametasona, Dextriguldipina, Digoxina, Diidrochitochalsina B, Diltiazem, Dipiridamol, Doxepina, Doxorubicina, Efonidipina, Eletriptano, Emetina, Endosulfano, Epiabeodendroidina F, Ergometrina, Ergotamina, Eritromicina, Estramustina, Etoposídeo, Felodipina, Fentanila, Fluconazol, Fluoxetina, Flufenazina, Fluvoxamina, Galopamil, Genisteína, Haloperidol, Hidrocortisona, 1V-Hidroximidazolam, Indinavir, Itraconazol, Ivermectina, Lansoprazol, Loperamida, Loratadina, Lovastatina, Manidipina, Metadona, Metoprolol, Mibefradil, Miconazol, Midazolam, Morina, Morfina, Naringenina, Nefazodona, Nelfinavir, Nicardipina, Nifedipina, Nilvadipina, Nisoldipina, Nitrendipina, Nobiletin, Norverapamil, Omeprazol, Pafenolol, Pantoprazol, Pimozida, Piperina, Polissorbato 80, Pristinamicina, Progesterona, Prometazina, Valspodar, Quercetina, Quinacrina, Quinidina, Quinina, Ranitidina, Rapamicina, Reserpina, Ritonavir, Saquinavir, Silimarina, Sinvastatina, Sirolimos, Mepfenitoína, Sufentanil, Talinolol, Tamoxifeno, Taxol, Terfenadina, Tetrandina, Trimetoxibenzoiliorimbina, Troleandomicina, Valinomicina, Verapamil, Vimblastina, Vincristina.</p>

Quadro1. Substratos e Inibidores da P-gp.

Sabe-se que a P-gp possui mais de um sítio de ligação que podem ser ocupados pelos substratos e que os dois locais de ligação do ATP também estão envolvidos com a função de transporte de fármacos. Supõe-se então que a inibição do transporte de um fármaco pode ocorrer graças à competição com outro fármaco pelo sítio de ligação do ATP ou pela inibição da hidrólise de ATP. Porém, devido à complexidade do mecanismo de inibição da P-gp não é possível prever futuras interações medicamentosas mediadas pela P-gp quando dois fármacos são co-administrados. O processo de indução também ainda não está bem definido, sendo que vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que, em alguns casos, a indução da P-gp pode ser dependente da dose do fármaco administrado, além de haver algumas diferenças que podem ser atribuídas às características do tecido onde ela é induzida. (LIN, 2003)

As interações farmacológicas podem ser definidas como a possibilidade de um fármaco poder alterar a intensidade das ações farmacológicas de outro, seja administrado anteriormente ou em simultâneo. Como consequência pode ocorrer o aumento ou a diminuição do efeito de um ou de ambos os fármacos, um novo efeito também pode surgir, efeito este que não seria produzido pelos fármacos quando administrados sozinhos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A farmacocinética dos diversos fármacos pode ser afetada na presença ou ausência de inibidores e/ou indutores de P-gp através: da alteração da absorção através do trato gastro-intestinal, interferência com o uptake celular de órgãos vitais, como por exemplo o cérebro ou da modificação da clearance renal e hepática (VARMA *et al.*, 2003)

Quando ocorre a co-administração de fármacos podem surgir interações medicamentosas como consequência da ação da P-gp, uma vez que é vasto o número de compostos que possuem a capacidade de interagir com esta proteína transportadora atuando como substratos, inibidores ou indutores. Estas interações podem diminuir a eficácia terapêutica ou potencializar efeitos secundários tóxicos (ALVES *et al.*, 2011). Os fármacos que induzem a proteína podem diminuir a biodisponibilidade de outros e, por outro lado, a sua inibição pode aumentar a biodisponibilidade para níveis potencialmente perigosos, sobretudo quando o fármaco em questão apresenta uma margem terapêutica estreita (CASCORBI, 2012).

Contudo também é possível a ocorrência de interações benéficas podendo por exemplo, resultar num aumento da eficácia terapêutica, redução de efeitos tóxicos ou obtenção de maior duração de efeito. Contudo, na maior parte das situações, é possível que a ocorrência de interações conduza à redução do efeito terapêutico e aparecimento de efeitos não desejados e prejudiciais, que podem resultar na necessidade de internação do paciente ou até na sua morte. Ao nível da farmacocinética a interação pode ocorrer durante a absorção, a distribuição, a biotransformação e a eliminação do fármaco e sofrer influência de fatores genéticos (nomeadamente no que respeita à biotransformação de medicamentos) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012)

A R diminui a biodisponibilidade do β -bloqueador talinolol em humanos e a expressão de P-gp intestinal demonstrou estar relacionada com a clearance sistémica do talinolol (FROMM, 2004). Um estudo foi observado um aumento da clearance do talinolol administrado por via intravenosa após administração de rifampicina. Este aumento pode ser atribuído, à intensificação da clearance intestinal através da P-gp. O aumento da clearance renal e a eliminação através da bile aparentam ser de menor relevância (WESTPHAL *et al.*, 2000). Os autores também sugerem que a indução de rifampicina resulta numa indução bastante seletiva da P-gp na parede intestinal, referindo que observaram uma diminuição acentuada de talinolol na AUC e consequentemente um aumento da clearance quando a rifampicina foi administrada e a

diminuição significativa do tempo de meia-vida do talinolol após a coadministração de rifampicina, sendo este fenômeno explicado pela indução ativa da secreção intestinal do talinolol, que providencia uma maior via de clearance diminuindo desta forma o tempo de meia-vida. A excreção cinética do talinolol é considerada uma mistura complexa da modulação da absorção intestinal pela P-gp e pela secreção que decorre em paralelo com a eliminação renal e clearance através da bÍlis (WESTPHAL *et al.*, 2000).

A biodisponibilidade oral da digoxina foi avaliada num estudo realizado com oito voluntários sãos, no qual se observou um decréscimo de 30% do esperado durante o tratamento com R. As biopsias intestinais fornecidas pelos mesmos voluntários antes e após a administração de R revelou um aumento significativo da expressão da P-gp intestinal após a administração do antibiótico, este resultado encontra-se correlacionado inversamente com a AUC da digoxina oral (BEIJNEN *et al.*, 2007).

O pré tratamento com a R demonstrou pouca eficácia na clearance renal de digoxina. Estes resultados indicam que a interação entre estas duas moléculas ocorre maioritariamente a nível intestinal e que a exposição crônica à R pode originar a indução de P-gp (MALINGRÉ *et al.*, 2001).

A P-gp está envolvida na resistência múltipla a drogas apresentada por células tumorais (D *et al.*, 2000). Estudos “in vitro” com células transformadas detectaram um fenótipo de resistência múltipla a drogas frequentemente associado com altas expressões de P-gp (SIEGSMUND *et al.*, 2002). Igualmente, evidências indicam que variações na atividade e expressão da P-gp podem reduzir ou aumentar a biodisponibilidade de fármacos (HOFFMEYER *et al.*, 2000)

Diante do exposto, polimorfismos que afetem na mudança da atividade/expressão da P-gp podem fazer com que haja mudança na concentração plasmática dos fármacos anti-TB, fazendo com que não haja a dose terapêutica adequada contribuindo assim para o aumento do desenvolvimento da resistência medicamentosa a rifampicina e etambutol.

A importância da associação dos polimorfismos no gene *ABCB1* como marcador de risco para a falha terapêutica pode contribuir para a implantação de um screening visando a individualização terapêutica na rotina clínica a fim de minimizar/mitigar eventos adversos e garantindo assim a eficácia do tratamento e conseqüentemente melhorando a qualidade de vida do paciente, sem retardo no tratamento.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil genético dos pacientes sob terapia anti-TB, quanto ao gene *ABCBI* e sua possível associação com a resistência a rifampicina e etambutol associado ou não a outros fármacos do esquema básico do tratamento anti-TB

4.2 Objetivos específicos

- Descrever a frequência das cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* e suas classificações.
- Analisar as possíveis associações genotípicas/alélicas/haplotípicas do gene *ABCBI* com a resistência aos fármacos do esquema anti-TB.
- Analisar as possíveis associações genotípicas/alélicas/haplotípicas do gene *ABCBI* com a resistência a rifampicina associado ou não a outros fármacos do esquema anti-TB.
- Analisar as possíveis associações genotípicas/alélicas/haplotípicas do gene *ABCBI* com a resistência a etambutol associado ou não a outros fármacos do esquema anti-TB.
- Analisar o uso concomitante de fármacos inibidores/indutores da P-gp e sua possível associação com a resistência aos fármacos do esquema anti-TB, a rifampicina e a etambutol.

5. RESULTADOS

Esta dissertação foi realizada na forma de redação de artigo. A análise da associação dos polimorfismos do gene *ABCBI* tendo como desfecho de interesse a resistência aos fármacos do esquema básico principalmente rifampicina e etambutol em pacientes com tuberculose no Rio de Janeiro está apresentada no manuscrito intitulado “*ABCBI gene polymorphism associated with clinical factors can predict drug-resistant tuberculosis.*” submetido ao periódico Clinical Science em 03/04/2017, aceito em 01/06/2017 e classificado como Original paper.

Title: *ABCBI* gene polymorphism associated with clinical factors can predict drug-resistant tuberculosis

Authors: Yasmin Pontual¹, Vanessa S.S. Pacheco¹, Sérgio P. Monteiro², Marcel S. B. Quintana³, Marli J. M. Costa⁴, Valeria C. Rolla⁴, Liane de Castro¹.

¹Pharmacogenetics Research Laboratory, National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

²Human Genetic Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

³Technical Assistance of Clinical Research and Reference Services at National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Clinical Research Laboratory on Mycobacteria, National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author: Liane de Castro, Pharmacogenetics Research Laboratory, National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: liane.castro@ini.fiocruz.br. Phone: (+55 21) 3865-9558; Fax: (+55 21) 2590-9998.

Abstract

Polymorphism in *ABCB1* gene encoding P-glycoprotein, a transmembrane drug efflux pump, contributes to drug resistance and have been widely studied, however, their association with rifampicin and ethambutol resistance in tuberculosis patients are still unclear. Genotype/allele/haplotype frequencies in c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) and c.3435C>T (rs1045642) were obtained from 218 patients, of these, 80 patients with rifampicin and/or ethambutol resistance were selected as case group and 138 control-group through the result of their culture and drugs sensitive test. Patients aging <18 years old and HIV positive serologic test were excluded. The *ABCB1* polymorphisms were determined using a polymerase chain reaction, direct sequencing approach and restriction fragment length polymorphism. A nomogram was constructed to simulate a combined prediction of probability to anti-tuberculosis drug resistance, genotype c.1236C> T (rs1128503) ($p= 0.02$), clinical form ($p= 0.03$), previous treatment ($p=0.01$) and skin color ($p = 0.03$), have a chance of up to 90% of developing anti-tuberculosis drug resistance. Considering genotype analyzes, CT (rs1128503) demonstrated an increased chance to anti-tuberculosis drugs resistance (odds ratio: 2.34, $p= 0.02$), while the analyses for ethambutol resistance revealed an association of rare allele “A” (rs2032582) (odds ratio: 12.91, $p=0.01$), the haplotype TTC (odds ratio: 5.83, $p= 0.05$) and any haplotype containing the rare allele “A” (odds ratio: 7.17, $p=0.04$). The *ABCB1* gene polymorphisms in association with others risk factors contribute to anti-tuberculosis drugs resistance mainly ethambutol. The use of the nomogram described in this study could contribute to the clinical decision before starting tuberculosis treatment.

Keywords: P-glycoprotein (*ABCB1*); single nucleotide polymorphism; antibiotics resistance; tuberculosis

Introduction

Tuberculosis (TB) disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) remain a major cause of death from infectious disease in the world. Every year, 2 million people die due to this disease (1). The combination treatment with rifampicin (R), isoniazid (H), ethambutol (E) and pyrazinamide (Z) is the standard therapy for TB cases. Nevertheless, in last decades MTB strains resistant to anti-TB drugs have been emerging (2). In 2015, an estimated 480.000 people worldwide developed resistance to anti-TB drugs and 100.000 people with rifampicin-resistant (1). In Brazil, 8.9 thousand resistant TB cases were notified, of them, 1.4 thousand were new cases and 7.5 thousand were retreatment cases (3).

The emergence of resistant strains cannot always be attributed to factors linked to bacteria genetics but also to host genetic variations (4). Gene polymorphisms encoding drugs metabolizing enzymes or membrane transporters such as efflux pump could have impact in resistance to TB treatment. P-glycoprotein (P-gp) is a transmembrane drug transporter encoded by the multidrug resistance *MDR1* (*ABCB1* gene), this transporters are key molecules in the drug uptake and efflux (5). Expression of P-gp is present in several organs such as liver, kidney, colon, placenta and others cells including leukocytes and have functions in the transport and/or secretion of its substrates as well as the protection of this tissues from physiologically active substances, cytotoxic agents and xenobiotics (6). In recent years, a large number of single nucleotide polymorphism (SNP) of *ABCB1* gene have been described, among them, nonsynonymous mutation, c.2677G>T/A (rs2032582), that change an Alanine to either Serine or Threonine and synonymous mutations, c.3435C>T(rs1045642) and c.1236C>T(rs1128503), that influence messenger RNA stability (7). These mutations are associated with variations in expression/activity of P-gp that may affect the

pharmacokinetics/pharmacodynamics of the drugs reducing or increasing their biodisponibility (8), therefore, it have been most widely studied mainly in resistance of anticancer drugs (6). The degree of expression and the functionality of *ABCB1* gene product can directly affect the therapeutic effectiveness of such drugs (9).

The P-gp has been described in mononuclear phagocytes (10), it is known that macrophages are central role in the TB pathogenesis, thus we hypothesized that differences in drug efflux transporters would alter anti-TB drugs intracellular concentrations. Since among the drugs standard to TB treatment, the rifampicin and ethambutol are substrate of P-gp (11), thus, *ABCB1* gene polymorphism that encode P-gp could be a predictor in occurrence of tuberculosis-resistant cases.

The literature is scant of information about *ABCB1* gene in TB patients. One study was conducted in Mexico to evaluate the association of *ABCB1* polymorphism and multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) (12), however, the study used a small casuistic and presented a problem in the control population selection. In our knowledge, our study is the first conducted in a Brazilian population treated for TB aiming evaluate a possible association of *ABCB1* polymorphism with rifampicin and/or ethambutol-resistance.

2. Methods

2.1. Study design and patients

This was a case-control study of patients under TB treatment in the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil from October 2009 to March 2015. The INI-

FIOCRUZ Ethics Committee approved this protocol under the number CAAE 0048.0.009.000-09.

All patients with positive culture for MTB were selected and grouped according with the drug susceptibility test (DST) result. Patients who were resistant to R and/or E associated or not to others anti-TB drugs were selected as cases and those patients without drugs-resistance as controls. Patients aging <18 years old and HIV- positive serologic test were excluded.

To characterize the population studied, demographic, laboratorial and clinical data were obtained from medical records. The alleles/genotype/haplotype profile of patients, in relation to SNP c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) and c.3435C>T (rs1045642) of *ABCB1* gene, were evaluated as possible predictors to anti-TB drugs resistance. Other possible predictors to anti-TB drugs resistance were also evaluated such as; patient's age (years), gender, ethnicity (classified as white or nonwhite-skin-color according to personal report), TB clinical forms (defined as pulmonary, extrapulmonary and disseminated), tobacco use (defined as current use reported by the patient), alcoholism (defined by a positive CAGE questionnaire), illicit drug use, tuberculosis previous treatments, their default (defined as starting therapy and having a treatment interruption of two or more consecutive months) and use of drugs substrates/inhibitors of P-gp.

For risk factors analyzes, the control-group were compared to case-group for resistant to any anti-TB drugs (n=80). In analyzes for genetic factors, case-group was divided into three categories: patients resistant to any anti-TB drugs (n = 80), patients resistant to R associated or not with other anti-TB drugs (n =76) and E-resistant (n =16) patients

associated or not with other anti-TB drugs. Each of three categories was compared to control-group.

2.2. Genetic Molecular Analyses

DNA sample and extraction

After signed written consent, 5mL of blood were collected in tubes containing EDTA, the genomic DNA was extracted from 0.2mL of blood samples using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA) according to manufacturer's instructions.

***ABCB1* genotyping**

For molecular identification of the *ABCB1* gene polymorphism (GenBank accession number: NT_007933) The SNPs c.1236C>T (rs1128503) and c.3435C>T (rs1045642) were analyzed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). For limitations on restriction enzymes use evaluation of the SNP c.2677G>T/A (rs2032582), was performed PCR-direct sequencing approach. For the molecular assay, PCR conditions were: 50µL reaction mixtures contained 3µL DNA, 0.4mM each primer (Table 1), 0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂ and 2.0 units of Platinum TaqDNA polymerase (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, USA), was thermocycled in an Eppendorf-Master Cycler-PCR machine with the following conditions: denaturation at 95°C for 5min, followed by 35 cycles at 95°C for 60s, 63°C for 60s, 72°C for 60s and extension at 72°C for 10min. The presence of fragment-size of each region amplified was detected on 2.0% agarose gel followed by GelRed™ staining (Biotium). The DNA

image was digitalized using a transiluminator with a system of image capture L-PIX-ST and L-PIX IMAGE 7.1 M Pixel.

The analyses of c.1236C>T (rs1128503) was performed digesting the PCR products of 370 base pairs (bp) in length using HaeIII enzyme (NEW ENGLAND BioLabs® Inc.). If the samples do not contain any mutation, the sizes of fragments generated were 270bp, 65bp and 35bp, the present of heterozygous mutation with the sizes of 270bp, 100bp, 65bp and 35bp, while bands of 270bp and 100bp indicated that samples were homozygous for mutation.

For direct sequencing of mutations at position c.2677G>T/A (rs2032582), the PCR's products were purified using the Wizard SV Gel and PCR clean-Up System Kit (Promega, USA) according to manufacturer's instructions. Big Dye Terminator™ Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Inc., USA) was used for further direct DNA sequencing. Base composition analyses were made on an ABI Prism®3730 DNA Analyzer at an institutional genomic facility (RPT01A-PDTIS/FIOCRUZ) [22]. The GenBank sequence [NT_007933](#) were used as reference for *ABCB1* gene. The sequences were edited and assigned using Sequencher 4.1.4 software (Demo version).

The PCR products for c.3435C>T (rs1045642) that contain the recognition site for MboI enzyme (NEW ENGLAND BioLabs® Inc.) indicates the wild type sample with the fragment length 162bp and 88bp, while mutate samples present fragment length with 250bp, heterozygous samples indicated fragments sizes of 250bp, 162bp and 88bp.

The mutations results performed with RFLP (rs11228503 and rs1045642) were confirmed by direct sequencing assay.

Statistical Analysis

Deviations from Hardy e Weinberg equilibrium (HWE) were assessed by Chi-square tests. The proportion of individuals carrying each *ABCBI* gene was computed for cases and controls separately. Differences between cases and controls were expressed as odds ratios (ORs). To evaluate the associations between genetic and other predictors (demographic, clinical and behavioral) with each outcome (resistance, resistance to ethambutol, and resistance to rifampicin) we used Logistic Models. Initially, non-genotypic predictors were selected and only significant ones were used as control variables for each genetic predictor in the multivariate models. To evaluate the association of genotypes with non-genetic predictors, the Kruskal-Wallys, Chi-square and Fisher Exact tests were used, as appropriate. To help the readers to predict the anti-TB drugs resistance or estimate the probability to occur anti-TB drugs resistance, a nomogram was constructed from the fitted logistic model. This graphically represents a probability score to resistance. The significance level was set at 0.05 and the program used for analyzes was R version 3.2.2.

Results

Characteristics of patients

This study included 858 TB patients, among whom 218 fulfilled the inclusion criteria. Of these, 80 were selected as case group and 138-control group through the result of their DST. Resistance characteristics of 80 MTB strains isolated from patients are described in Table 2. MDR-TB was detected on most (85%) of the cases selected.

Patient's characteristics such as age, gender and drugs, alcohol and tobacco use were similar among cases and controls. The TB disseminate clinical form and the white-skin

color was a protector factor for having resistance. The higher risk of resistance to anti-TB drugs was observed among patients who had a previous story TB treatment OR=10.21 (5.08-21.63). Default was not a risk factor for resistance in our study (Table 3).

Genotypes, alleles and haplotypes in patients

The Hardy-Weinberg equilibrium test on the genotype and allele of the two groups of patients demonstrated that the population is Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

In case-group resistant to any drugs, the genotype analyses of c.1236C>T (rs1128503) showed that CT genotype when compared with wild-type homozygous found an association with resistance to any anti-TB drugs (OR: 2.34, p=0.02). However, no significant differences were found in the frequencies of the others polymorphisms c.2677G>T/A (rs2032582) and c.3435C>T (rs1045642). About the haplotype analyses, TTC demonstrated an association to resistance (OR: 7.22, p=0.03) (Table 4).

In the group resistant to R associated or not others drugs, genotype, allele and haplotype frequencies showed no statistical differences for any of the polymorphisms studied. Regarding patients resistant to E associated or not others drugs, the analysis showed a statistical significant about rare A allele of c.2677G>T/A (rs2032582) (OR: 12.91, p=0.01.), the GA genotype (OR: 16.37, p=0.01) and haplotype analysis TTC (OR: 5.83, p= 0.05) and any haplotype that contain rare A allele (OR: 7.17, p=0.04) (Table 5).

Prediction Score

In the multivariate analysis, a final model including variables was fit. The probabilities score was developed based on the nomogram. The graph simulates a combined prediction behaves. In the first category of the group patients resistant to any anti-TB drugs, genotype c.1236C>T (rs1128503) ($p=0.02$), clinical form ($p=0.03$), previous treatment ($p<0.01$) and skin color ($p=0.03$). In Figure 1, as an example on how to use nomogram, suppose that a patient is CT genotype. Draw a vertical line from 'C/T' toward the upper line of the graph and register the points (52 points). The same patient has pulmonary clinical form (68 points); more than a previous treatment (100 points) and nonwhite-skin-color (38 points). Total points summed approximately 258. To ascertain the probability represented by this score, draw a vertical line from the 'Total points' line toward 'Probability to Resistance' almost 90%. In Figure 2, the same nomogram is represented, but with the category of resistance to ethambutol.

Discussion

Drug resistance is a matter of a great concern for TB control programs and drug-resistant TB has different trends according to the regions (13). Better comprehension of the risk factors associated with MDR-TB strains is highly significant in developing a national policy for public health interventions (14).

The lack of TB treatment compliance not always could explain the risk to TB resistant (15), therefore, the genetic markers are great value, mainly in TB treatment. Nowadays, immune-related genes polymorphisms, such as SLC11A1, some HLA genes, TLR7, TLR8 and INFG, have been associated with increased susceptibility to pulmonary TB. Nevertheless, only a few reports exist regarding the role of host pharmacogenetics that

may lead to the development of TB resistant forms (12). Due to this, we hypothesized that polymorphism in the *ABCB1* gene would contribute to better understanding anti-TB drugs resistance development.

There are conflicting findings in the literature about polymorphism c.1236 C>T (rs1128503) located in exon 12, which characterizes silent mutation that do not exert effect on the structure and function of P-gp, but changes the substrate specificity, contributing to altered substrate pharmacokinetics (16). Some studies showed a better therapeutic response in-group with homozygous CC or heterozygous CT when compared with TT genotype (17). In another study with epilepsy patients, homozygous TT was associated with better outcomes (18). Actually, our study found that heterozygous patients (CT) have 2-fold chance to have resistance to anti-TB drugs, suggesting that each drug should be evaluated according with specificity of P-gp. In addition, the concomitant use of P-gp substrates/ inhibitors that compete for the same anti-TB drug binding-site, could affect bioavailability. Nevertheless, our statistical analyses did not found significant association, corroborating with the clinical trials results that tested P-gp inhibitors (19).

Regarding c.2677G>T/A (rs2032582) located in exon 21, genotypic analyses containing T allele did not found any association with anti-TB drug resistance. In the other hand, the analyses with rare A allele, that have the greatest impact on both activity and P-gp substrate specificity (10), demonstrated an association with ethambutol-resistance and the A allele as well as genotype/haplotype containing this rare allele, corroborating with another study (12).

The three SNPs in loci c.1236C>T, c.2677G>T/A and c.3435C>T of *ABCB1* gene located in exon 12, 21 and 26 respectively are closely connected. Haplotype is the

combination of SNPs that are located and interconnected in a specific region of chromosome (18). Our study showed that the TTC haplotype increases 5-fold the chance to ethambutol-resistance. In fact, the presence of mutant alleles located in exon 12 and 21, alter P-gp affinity and activity substrate-related (12,16). However, the same haplotypes can confer a favorable response to others substrates, for example the phenytoin (18), confirming the affinity substrate-dependent. Moreover, other discrepancies between responses in many diseases correlated with *ABCB1* gene polymorphism have been described, reasons for this discrepancy may be due: to the population heterogeneity, sample size, incomplete phenotype (20) or still the genotypic analyzes without the haplotype analyses. In addition, the inherited component of the response to drugs is typically polygenic, so the impact of a single gene may be confounded by influences from other genes and by environmental factors (21).

Concerning risk factors not related with pharmacogenetics, our study showed that white-skin patients are less expected to have resistance to anti-TB drugs compared to nonwhite-skin. One study showed that nonwhite-skin individuals macrophages allow significantly greater bacillary replication than those white-skin individuals (22) showing that nonwhite-skin individuals are more susceptible to TB (23). Therefore, the TB susceptibility in certain population could be directly related to TB recurrence and could result a large amount of treatments as well as the probability to have anti-TB drugs resistance. In fact, our results showed a 10-fold higher frequency of resistance to anti-TB drugs in patients with more than one previous treatment as showed by other authors (14, 24). A previous treatment, even an adequate one, still represents a major risk factor for MDR-TB (25).

Regarding the TB clinical forms, several studies have described a high probability to have resistant-TB in pulmonary clinical form (14, 26). The bacteria

multiplication inside the lung, as an organ with high level of oxygenation, favors the bacilli development (27). Besides, the drug are easily distributed in lung, a high-perfused organ, enabling the higher drugs concentration and consequently the greater probability of bacteria developing resistance (27). Corroborating with this information, the finding of our study demonstrated that disseminated clinical form is a protector factor to resistant-TB.

Thus, having nonwhite-skin-color, pulmonary TB, previous TB treatment and the genotype CT in exon 12 and GA in exon 21, A allele in exon 21 and TTC haplotype or any haplotype contain A allele of *ABCB1* gene are associated with higher chance to develop TB-resistance. Based in these results, we constructed a nomogram that simulate the chance to have anti-TB drugs resistance. A nomogram is a useful tool for clinical decision in order to evaluate TB-resistant probability. All risk factors should be in mind when the drugs are chosen to compose a regimen to prevent treatment resistance.

Conclusion

Resistant strains cannot always be attributed to factors linked to bacteria genetics but also to host genetic variations. This study demonstrated that interindividual variability in anti-TB treatment with P-gp substrate drugs is clinically relevant. According with knowledge it is the first study in Latin America involving combination of *ABCB1* gene SNPs in resistant-TB patients. Thus, we would like to suggest further study with larger sample size to correlate with these three SNPs analyzed, corroborating with nomogram application in clinical practice, since the clinical implementation of *ABCB1* genotyping in combination with other clinical information as described in the constructed nomogram could contribute to reduce drug-resistant tuberculosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the medical, technical and nursing staff of National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI) for their support, and L.S. Rosadas for technical assistance. We sincerely thank all patients for their participation in this study. We also thank P.C. Monteiro for English-language revision.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare there are no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The work presented here was carried out in collaboration between all authors.

Liane de Castro defined the research theme and designed methods and experiments. Yasmin Pontual carried out the laboratory experiments, data and collected clinical data, Sérgio P. Monteiro analyzed the molecular data, Marli J. M. Costa was the physician that treated the patients and obtained a patient's written informed consent. All authors worked on patient's data collection, interpreted the results and wrote the paper. All authors have contributed to, seen and approved the manuscript.

ABREVIATIONS

HIV, Human immunodeficiency virus; MTB, Mycobacterium tuberculosis; DST, drug susceptibility test; SNP, single nucleotide polymorphism; HWE, Hardy e Weinberg equilibrium; IC, confidence interval; CIOMS, Council of International Organizations of Medical Sciences.

Referências

1. WHO |Global tuberculosis report 2016 [Internet]. WHO. [citado 24 de março de 2017]. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, Soolingen D van, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*. 22 de maio de 2010;375(9728):1830–43.
3. WHO. Global tuberculosis report 2015 [Internet]. World Health Organization; 2015 [citado 5 de março de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/191102> -
4. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clin Microbiol Rev*. abril de 2013;26(2):185–230.
5. Kimura Y, Morita S, Matsuo M, Ueda K. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Sci*. setembro de 2007;98(9):1303–10.
6. Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New J Sci*. 20 de maio de 2014;2014:e476974.
7. Tovilla-Zárate CA, Vargas I, Hernández S, Fresán A, Aguilar A, Escamilla R, et al. Association study between the MDR1 gene and clinical characteristics in schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr Sao Paulo Braz* 1999. setembro de 2014;36(3):227–32.
8. Schinkel AH. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *Int J Clin Pharmacol Ther*. janeiro de 1998;36(1):9–13.
9. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 de março de 2000;97(7):3473–8.
10. Gollapudi S, Reddy M, Gangadharam P, Tsuruo T, Gupta S. Mycobacterium tuberculosis Induces Expression of P-Glycoprotein in Promonocytic U1 Cells Chronically Infected with HIV Type 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 31 de março de 1994;199(3):1181–7.
11. Hartkoorn RC, Chandler B, Owen A, Ward SA, Bertel Squire S, Back DJ, et al. Differential drug susceptibility of intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberc Edinb Scotl*. maio de 2007;87(3):248–55.
12. Rodríguez-Castillo JA, Arce-Mendoza AY, Quintanilla-Siller A, Rendon A, Salinas-Carmona MC, Rosas-Taraco AG. Possible association of rare polymorphism in the ABCB1 gene with rifampin and ethambutol drug-resistant tuberculosis. *Tuberc Edinb Scotl*. setembro de 2015;95(5):532–7.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Panorama da tuberculose no Brasil 2014. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/panorama%20tuberculose%20brasil_2014.pdf

14. Elmi OS, Hasan H, Abdullah S, Mat Jeab MZ, Bin Alwi Z, Naing NN. Multidrug-resistant tuberculosis and risk factors associated with its development: a retrospective study. *J Infect Dev Ctries*. 29 de outubro de 2015;9(10):1076–85.
15. Amante TD, Ahemed TA. Risk factors for unsuccessful tuberculosis treatment outcome (failure, default and death) in public health institutions, Eastern Ethiopia. *Pan Afr Med J [Internet]*. 16 de março de 2015 [citado 24 de março de 2017];20. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4484196/>
16. Farhat K, Waheed A, Azhar H, Pasha A, Ismail M, Mansoor Q. Genotype Frequencies of C1236T Polymorphism of the ABCB1 Gene in Various Ethnic Groups of Pakistan. *Ann. Pak. Inst. Med. Sci*. 2014; 10(1):3-6
17. Onodera M, Endo K, Kakuta Y, Kuroha M, Kimura T, Hiramoto K, et al. ATP-binding cassette subfamily B member 1 1236C/T polymorphism significantly affects the therapeutic outcome of tacrolimus in patients with refractory ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 30 de janeiro de 2017;
18. Sun F, Cao B-Q, Wang B, Wu S-Q, Jiang D-H. Association between ABCB1 genetic polymorphism and the effect on epilepsy following phenytoin treatment. *Exp Ther Med*. setembro de 2016;12(3):1780–4.
19. Kosztu P, Dolezel P, Vaclavikova R, Mlejnek P. Can the assessment of ABCB1 gene expression predict its function in vitro? *Eur J Haematol*. agosto de 2015;95(2):150–9.
20. Palmieri O, Latiano A, Valvano R, D’Inca R, Vecchi M, Sturniolo GC, et al. Multidrug resistance 1 gene polymorphisms are not associated with inflammatory bowel disease and response to therapy in Italian patients. *Aliment Pharmacol Ther*. dezembro de 2005;22(11–12):1129–38.
21. Manna I, Gambardella A, Labate A, Mumoli L, Ferlazzo E, Pucci F, et al. Polymorphism of the multidrug resistance 1 gene MDR1/ABCB1 C3435T and response to antiepileptic drug treatment in temporal lobe epilepsy. *Seizure*. janeiro de 2015;24:124–6.
22. Crowle AJ, Elkins N. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Infect Immun*. março de 1990;58(3):632–8.
23. Campos HS. Mycobacterium tuberculosis resistente: de onde vem a resistência? *Bol Pneumol Sanitária*. junho de 1999;7(1):51–64.
24. Ullah I, Javaid A, Tahir Z, Ullah O, Shah AA, Hasan F, et al. Pattern of Drug Resistance and Risk Factors Associated with Development of Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis in Pakistan. *PloS One*. 2016;11(1):e0147529.
25. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. Mycobacterium tuberculosis drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. março de 2017;23(3):154–60.
26. Mulu W, Mekonnen D, Yimer M, Admassu A, Abera B. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis patients in Amhara National Regional State. *Afr Health Sci*. junho de 2015;15(2):368–77.
27. Lachi T, Nakayama M. Radiological findings of pulmonary tuberculosis in indigenous patients in Dourados, MS, Brazil. *Radiol Bras*. 2015;48(5):275–81.

Table 1. Primers used in the PCR to amplify the coding region.

<i>Gene ABCB1</i>		<i>Primers</i>	Fragment size
rs1128503	Sense	5' TATCCTGTGTCTGTGAATTGCC 3'	370 bp
	Reverse	5' CCTGACTCACACACCAATG 3'	
rs2032582	Sense	5' AGGCTATAGGTTCCAGGCTTGCT 3'	455 bp
	Reverse	5' ACAGTGTGAAGACAATGGCCTGA 3'	
rs1045642	Sense	5' TGTTTTAGCTGCTTGATGGC 3'	250 bp
	Reverse	5' TGCTCCCAGGCTGTTTATTGA 3'	

Table 2. Distribution of resistance among 80 strains of *M. tuberculosis* isolated.

Resistance	n=80 (%)
R	6 (7.5)
E+S	1 (1.25)
H+E	1 (1.25)
H+S	2 (2.5)
R+H*	44 (55)
H+E+Z	1 (1.25)
R+H+S*	7 (8.8)
R+H+Z*	4 (5.0)
R+H+E*	8 (10)
H+Z+E+S	1 (1.25)
R+H+E+S*	3 (3.8)
R+H+Z+E*	1 (1.25)
R+H+Z+S*	1 (1.25)

*MDR-TB. R: rifampin; H: isoniazid; Z: pyrazinamide; E: ethambutol; S: streptomycin

Table 3. Risk factors associated with resistance to any anti-TB drugs

Risk factors			Univariate		Multivariate	
	Sensitives (n=138)	Resistants (n=80)	OR (IC95%)	P value	OR (IC95%)	P value
Age						
Median	35.5 (26±54)	38.5 (25,50.2)	1 (0.98-1.01)	0.74		
Gender						
Female	51 (62.2)	31 (37.8)	1			
Male	87 (64)	49 (36)	0.93 (0.53-1.64)	0.79		
Skin color						
No White	57 (52.8)	51 (47.2)	1		1	-
White	80 (73.4)	29 (26.6)	0.41 (0.23-0.71)	<0.01	0.46 (0.23-0.91)	0.03
Alcohol user						
No	68 (64.2)	38 (35.8)	1			
Yes	66 (65.3)	35 (34.7)	0.95 (0.54-1.68)	0.86		
Tobacco user						
No	92 (64.8)	50 (35.2)	1	-		
Yes	42 (63.6)	24 (36.4)	1.05 (0.57-1.92)	0.87		
Drugs user						
No	118 (63.4)	68 (36.6)	1	-		
Yes	17 (70.8)	7 (29.2)	0.71 (0.26-1.75)	0.48		
TB forms						
Pulmonary	101 (58)	73 (42)	1	-	1	-
Disseminated	22 (88)	3 (12)	0.19 (0.04-0.57)	0.01	0.2 (0.04-0.74)	0.03
Extrapulmonary	15 (78.9)	4 (21.1)	0.37 (0.1-1.07)	0.09	0.92 (0.24-2.84)	0.9
Previous treatments						
=1	123 (78.3)	34 (21.7)	1	-	1	-
>1	15 (24.6)	46 (75.4)	11.09 (5.65-22.86)	<0.01	10.21 (5.08-21.63)	<0.01
Number of Default						
=1	133 (64.3)	74 (35.7)	1	-		
>1	5 (45.5)	6 (54.5)	2.16 (0.63-7.71)	0.22		
Substrate Use / P-gp Inhibitors*						
No	104 (61.9)	64 (38.1)	1	-		
Yes	34 (68)	16 (32)	0.76 (0.38-1.48)	0.43		

*Examples such as: ranitin, losartan, omeprazole, digoxin

Table 4. Genetic characteristics associated with resistance to any drugs anti-TB.

Genetic predictors			Univariate		Multivariate	
	Sensitive (n=138)	Resistant (n=80)	OR (IC95%)	P value	OR (IC95%)	P value
Genotype						
c.1236 C>T [rs1128503]						
C/C	69 (66.3)	35 (33.7)	1	-	1	-
C/T	47 (56)	37 (44)	1.55 (0.86-2.82)	0.15	2.34(1.14-4.95)	0.02
T/T	22 (73.3)	8 (26.7)	0.72 (0.28-1.72)	0.47	0.65 (0.2-1.94)	0.45
c.2677 G>T/A [rs2032582]						
G/G	73 (66.4)	37 (33.6)	1	-	1	-
G/T	51 (60)	34 (40)	1.32 (0.73-2.37)	0.36	1.77 (0.88-3.66)	0.12
T/T	12 (66.7)	6 (33.3)	0.99 (0.32-2.76)	0.98	0.82 (0.2-3.08)	0.78
G/A	2 (40)	3 (60)	2.96 (0.47-23.21)	0.25	4.11 (0.51-37.13)	0.17
c.3435 C>T [rs1045642]						
C/C	57 (63.3)	33 (36.7)	1	-	1	-
C/T	62 (60.8)	40 (39.2)	1.11 (0.62-2.01)	0.72	1.85 (0.88-4.02)	0.11
T/T	19 (73.1)	7 (26.9)	0.64 (0.23-1.62)	0.36	0.54 (0.15-1.78)	0.33
Allele frequencies						
c.1236 C>T [rs1128503]						
C	185 (63.4)	107 (36.6)	1	-	1	-
T	91 (63.2)	53 (36.8)	1.01 (0.66-1.52)	0.97	1.11 (0.67-1.81)	0.69
c.2677 G>T/A [rs2032582]						
G	199 (64.2)	111 (35.8)	1	-	1	-
T	75 (62)	46 (38)	1.1 (0.71-1.69)	0.67	1.19 (0.71-2)	0.51
A	2 (40)	3 (60)	2.69 (0.44-20.65)	0.28	3.32 (0.44-28.55)	0.23
c.3435 C>T [rs1045642]						
C	176 (62.4)	106 (37.6)	1	-	1	-
T	100 (64.9)	54 (35.1)	0.9 (0.59-1.35)	0.6	1.01 (0.62-1.64)	0.98
Haplotype						
CGC	155 (64.6)	85 (35.4)	1	-	-	-
CGT	22 (59.5)	15 (40.5)	1.3 (0.52-11.62)	0.49	1.44 (0.72-19.87)	0.42
CTC	2 (28.6)	5 (71.4)	2.45 (0.35-2.81)	0.26	3.79 (0.32-3.33)	0.12
TGC	15 (68.2)	7 (31.8)	1 (0.22-5.16)	1	1.03 (0.33-11.03)	0.96
TGT	7 (63.6)	4 (36.4)	1.06 (1.29-24.62)	0.94	1.9 (1.22-42.73)	0.47
TTC	3 (27.3)	8 (72.7)	5.64 (0.52-1.46)	0.02	7.22 (0.51-1.77)	0.03
TTT	66 (67.3)	32 (32.7)	0.87 (0.36-5.99)	0.6	0.95 (0.38-8.71)	0.86
Rare	6 (60)	4 (40)	1.48 (0.62-2.73)	0.58	1.83 (0.04-0.92)	0.45

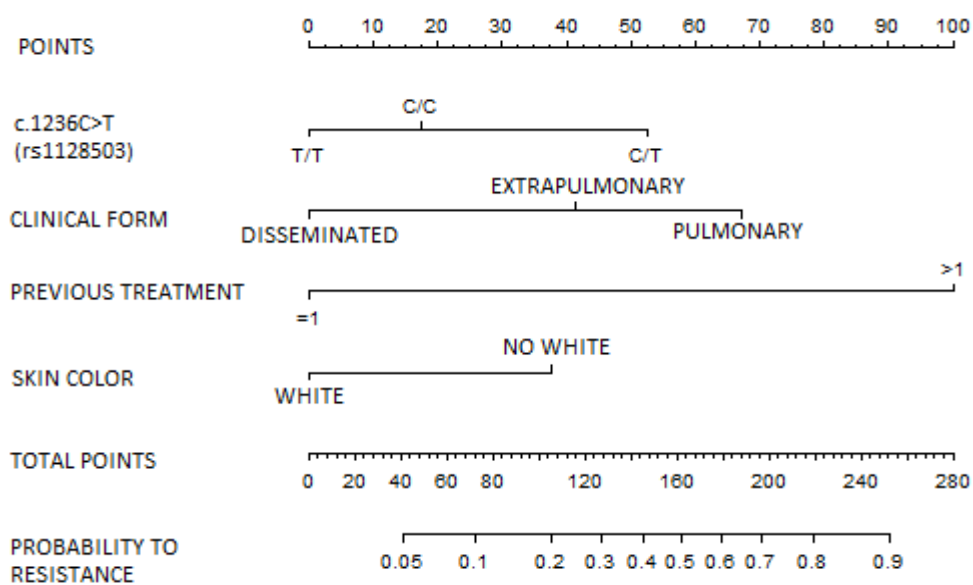
*Rare – All haplotypes containing rare allele.

Table 5. Genetic characteristics of the studied population with resistance to Ethambutol associated or not with other drugs.

Genetic predictors			Univariate		Multivariate	
	Sensitive (n=202)	Resistant E (n=16)	OR (IC95%)	P value	OR (IC95%)	P value
Genotype						
c.1236 C>T [rs1128503]						
C/C	99 (95.2)	5 (4.8)	1	-	1	-
C/T	75 (89.3)	9 (10.7)	2.38 (0.79-8)	0.13	2.6 (0.84-8.95)	0.11
T/T	28 (93.3)	2 (6.7)	1.41 (0.2-6.96)	0.69	1.5 (0.2-7.62)	0.64
c.2677 G>T/A [rs2032582]						
G/G	104 (94.5)	6 (5.5)	1	-	1	-
G/T	79 (92.9)	6 (7.1)	1.32 (0.4-4.36)	0.64	1.46 (0.43-4.94)	0.54
T/T	16 (88.9)	2 (11.1)	2.17 (0.3-10.39)	0.37	2.12 (0.28-10.65)	0.39
G/A	3 (60)	2 (40)	11.56 (1.34-84.3)	0.01	16.37 (1.73-136.27)	0.01
c.3435 C>T [rs1045642]						
C/C	82 (91.1)	8 (8.9)	1	-	1	-
C/T	95 (93.1)	7 (6.9)	0.76 (0.25-2.19)	0.6	0.97 (0.32-2.93)	0.95
T/T	25 (96.2)	1 (3.8)	0.41 (0.02-2.39)	0.41	0.41 (0.02-2.44)	0.41
Allele frequencies						
c.1236 C>T [rs1128503]						
C	273 (93.5)	19 (6.5)	1	-	1	-
T	131 (91)	13 (9)	1.43 (0.67-2.95)	0.34	1.5 (0.69-3.15)	0.29
c.2677 G>T/A [rs2032582]						
G	290 (93.5)	20 (6.5)	1	-	1	-
A	3 (60)	2 (40)	9.67 (1.22-61.62)	0.02	12.91 (1.52-89.2)	0.01
T	111 (91.7)	10 (8.3)	1.31 (0.57-2.82)	0.51	1.34 (0.58-2.95)	0.47
c.3435 C>T [rs1045642]						
C	259 (91.8)	23 (8.2)	1	-	1	-
T	145 (94.2)	9 (5.8)	0.7 (0.3-1.5)	0.38	0.75 (0.32-1.63)	0.48
Haplotype						
CGC	225 (93.8)	15 (6.2)	1	-	-	-
CGT	35 (94.6)	2 (5.4)	0.91 (0.19-12.58)	0.91	0.83 (0.36-2.81)	0.83
CTC	6 (85.7)	1 (14.3)	1.55 (0.75-14.81)	0.68	1.56 (0.73-15.22)	0.7
TGC	19 (86.4)	3 (13.6)	3.34 (0-0)	0.11	3.33 (0-0)	0.12
TGT	11 (100)	0 (0)	-	-	-	-
TTC	8 (72.7)	3 (27.3)	7.88 (0.32-2.65)	0.02	5.83 (0.36-2.81)	0.05
TTT	92 (93.9)	6 (6.1)	0.92 (0.93-39.74)	0.88	1 (1.07-48.1)	-
Rare	8 (80)	2 (20)	6.08 (0.18-4.57)	0.06	7.17 (1.16-10.6)	0.04

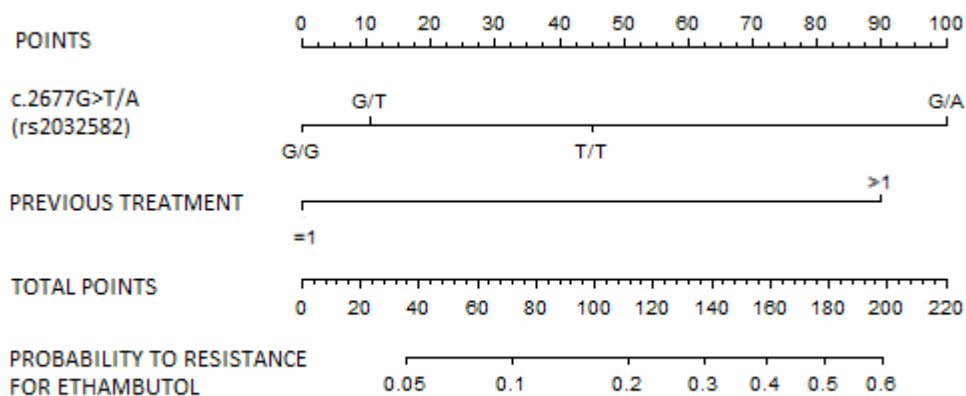
*Rare – All haplotypes containing rare allele.

Figure 1. Nomogram to estimate risk probabilities of resistance to any anti-TB drugs according to the study findings



Draw a vertical line from your patient characteristics toward the upper line and sum the points. After doing this for all characteristics, sum all points from all five characteristics and draw a vertical line from the 'Score' line toward the 'Probability to resistance'

Figura 2. Nomogram to estimate risk probabilities of resistance to Ethambutol according to the study findings.



Draw a vertical line from your patient characteristics toward the upper line and sum the points. After doing this for all characteristics, sum all points from all five characteristics and draw a vertical line from the 'Score' line toward the 'Probability to resistance for Ethambutol'

7. CONCLUSÕES

1. A TBMR foi detectada na maioria (85%) dos casos selecionados que é caracterizado pela resistência simultânea a rifampicina e isoniazida
2. Indivíduos de cor branca têm 80% menos chance de desenvolver resistência a fármacos anti-TB;
3. A forma clínica disseminada se mostrou um fator protetor em comparação a indivíduos com a forma pulmonar;
4. Pacientes que tiveram mais de um tratamento prévio tem 10 vezes a chance de ter resistência a fármacos anti-TB;
5. Pacientes com o genótipo CT no c.1236 C>T (rs1128503) tem 2 vezes a chance de desenvolver resistência a fármacos anti-TB;
6. Pacientes com haplótipo TTC tem 7 vezes a chance de desenvolver resistência especialmente a etambutol associados ou não a outros fármacos do esquema anti-TB;
7. Não foi encontrada associação dos polimorfismos do gene *ABCB1* com a resistência a rifampicina associada ou não a outros fármacos do esquema anti-TB
8. Pacientes com o genótipo heterozigoto contendo o alelo raro GA no c.2677G>T/A (rs2032582) tem 16 vezes a chance de desenvolver resistência a etambutol associado ou não a outros fármacos do esquema anti-TB;
9. Pacientes com o alelo A no c.2677 G>T/A (rs2032582) tem 12 vezes a chance de desenvolver resistência a etambutol associado ou não a outros fármacos do esquema anti-TB;
10. Pacientes com haplótipo contendo o alelo raro A tem 5 vezes o risco de desenvolver resistência a etambutol associados ou não a outros fármacos;
11. Não foi encontrada significância estatística no uso concomitante de substratos/inibidores da P-gp com os fármacos anti-TB neste estudo
12. O uso do nomograma criado neste estudo poderia contribuir para a decisão clínica antes da introdução do tratamento de TB.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado teve como objetivo verificar a possível associação dos polimorfismos do gene *ABCB1* e a resistência aos fármacos anti-TB especialmente rifampicina e etambutol por serem substratos da glicoproteína P, codificada pelo gene *ABCB1*

A rifampicina, fármaco da fase I e fase II do tratamento da tuberculose é um importante indutor de P-gp. A expressão de P-gp induzida pela rifampicina ocorre no intestino e no fígado, afetando a farmacocinética de fármacos administrados por via oral que são transportados por esta proteína. Por ser a rifampicina um potente indutor, e este fármaco estar sempre sendo transportado para fora da célula, é necessária uma alta dose para garantir a eficácia terapêutica. A baixa atividade de P-gp, oriunda de polimorfismos no gene é compensada pela alta expressão induzida pela rifampicina a este fato poderia ser um dos motivos pelo qual não encontramos associação dos mutantes com a resistência a rifampicina.

Porém, mesmo em pacientes em que estes polimorfismos não alterem a função/expressão desta proteína, fica a questão se este medicamento seria mesmo o adequado para ser utilizado no esquema básico do tratamento da tuberculose. Por conta do seu potencial indutor que independe dos polimorfismos, a concentração intracelular não alcançaria a dose efetiva, tendo então uma grande chance de ocorrer falha terapêutica. Na década de 60, os dois dos principais medicamentos utilizados nos esquemas terapêuticos eram a estreptomicina e isoniazida, antes da incorporação da rifampicina. Por conta da alta incidência de resistência a rifampicina no tratamento da tuberculose, a estreptomicina poderia ser o medicamento mais adequado para ser utilizado na primeira fase do tratamento associada a outros fármacos substratos da P-gp.

Etambutol é um importante substrato de P-gp descrito em 2007, é um fármaco administrado em concomitância com a rifampicina na fase I de tratamento. Com a indução de efluxo mediada por rifampicina, a biodisponibilidade de etambutol diminuiria, favorecendo assim o desenvolvimento de resistência aos fármacos anti-TB na primeira fase do tratamento. Corroborando com os achados do nosso estudo, em que foi visto associação dos polimorfismos do *ABCB1* e um aumento na resistência ao etambutol, o que não foi visto em relação a rifampicina.

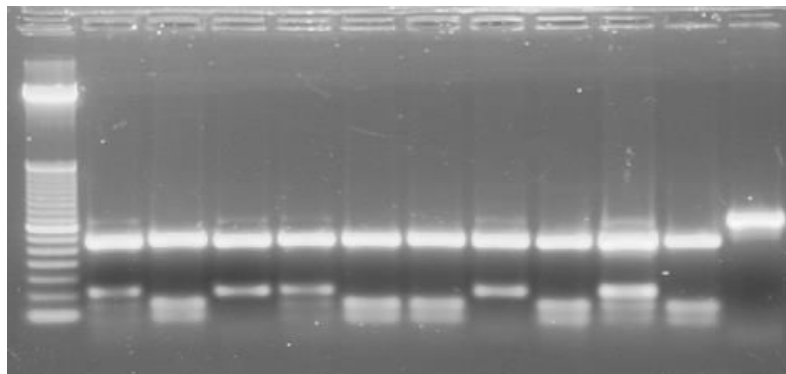
Apesar da influência de SNPs no gene *ABCB1* ter resultados contraditórios, Estudos recentes indicaram que a análise de haplótipo/genótipo/alelo pode ser mais poderosa para descrever as associações do que somente genótipo do *ABCB1*. Muitos estudos têm focado apenas em resultados genotípicos de SNPs individuais em vez de sua ligação para produzir haplótipos. Foi visto neste estudo que o diferencial é a análise haplotípica da população estudada, já que polimorfismos não significativos na análise genotípica em contraste tiveram associação na análise haplotípica.

Apesar de ser um estudo com objetivo farmacogenético, foi visto que fatores de risco estavam associados com o desenvolvimento de resistência a fármacos anti-TB, com isto foi criado um nomograma que poderia ser futuramente utilizado na conduta clínica antes de iniciar o tratamento de acordo com características de cada paciente.

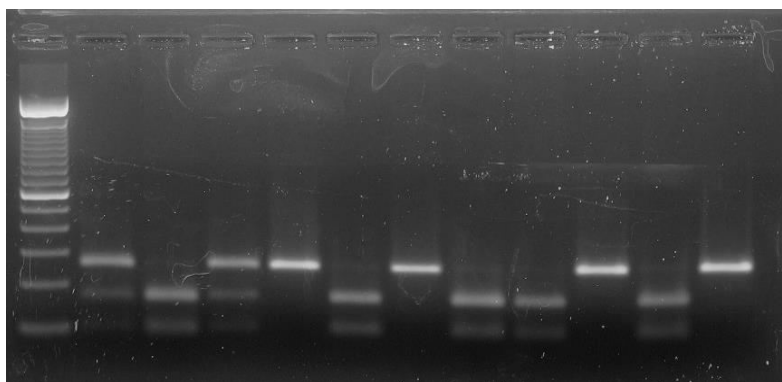
Na Figura 1, como exemplo de como usar o nomograma, suponha que um paciente seja genótipo de CT para o exon 12 (rs1128503). Desenhe uma linha vertical de 'C/T' para a linha superior do gráfico e registre os pontos (52 pontos). O mesmo paciente possui forma clínica pulmonar (68 pontos); Mais de um tratamento prévio (100 pontos) e cor da pele não branca (38 pontos). Pontos totais somados aproximadamente 258. Para determinar a probabilidade representada por essa pontuação, desenhe uma linha vertical da linha "Pontos totais" em direção a "Probabilidade de resistência" que equivale a quase 90%.

Na Figura 2, o mesmo nomograma é representado, mas com a categoria de resistência ao etambutol. Suponha que um paciente seja genótipo GA para o exon 21 (rs rs2032582) e registre 100 pontos. O mesmo paciente possui mais que um tratamento prévio de TB (90 pontos), tendo um total de pontos de 190 que equivale a quase 60% de chance de desenvolver a resistência a etambutol. Diante disto, a implementação do nomograma seria uma alternativa para diminuir a ocorrência da resistência nestes pacientes que seriam considerados pacientes de risco.

A identificação dos perfis genéticos em pacientes com TB pode possibilitar uma terapia otimizada para os fármacos que são substratos da P-gp. Essa identificação pode ser feita por técnicas de biologia molecular como PCR-RFLP e sequenciamento direto, sendo essa uma técnica considerada eficaz para este objetivo. Abaixo temos os perfis eletroforéticos da técnica de RFLP dos exons 12 e 26.

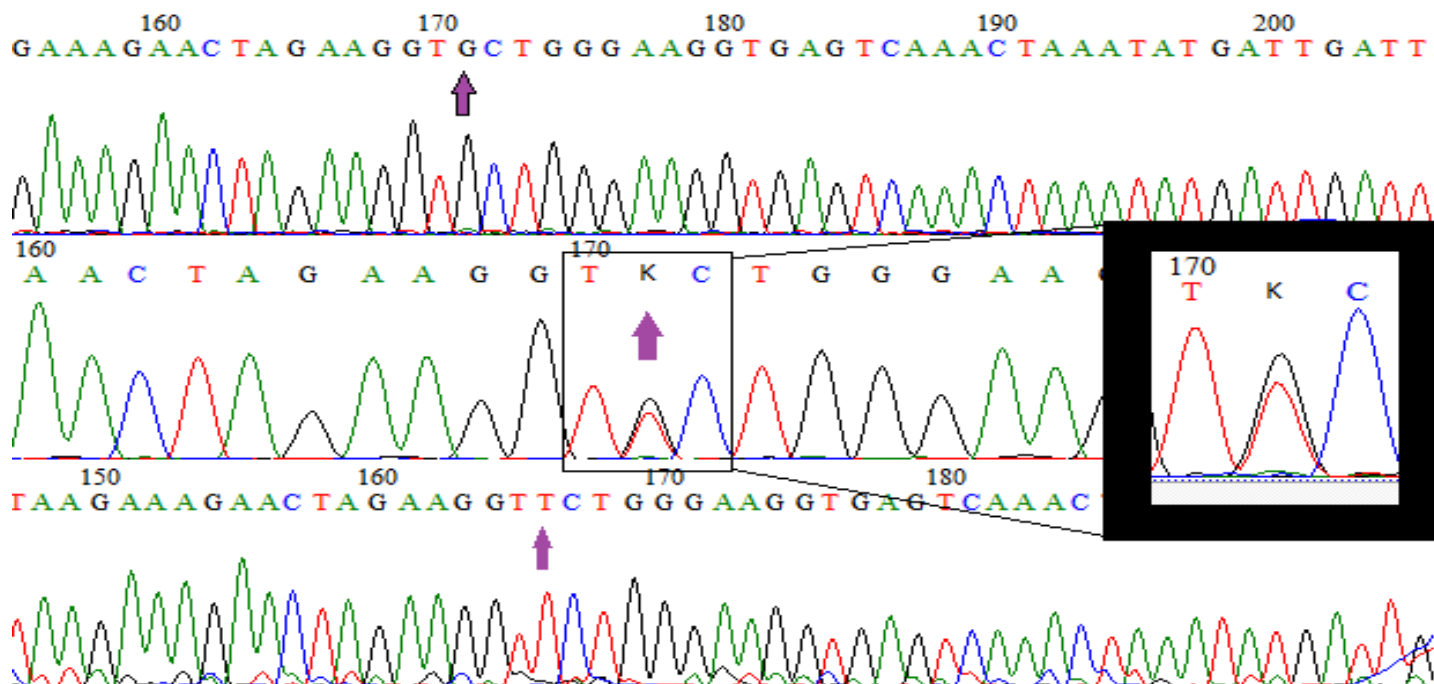


Exon 12. Tamanho do Amplicon: 370 bp. Mutante – 100 + 270
Wild type - 65 + 35 + 270 = 370 Heterozigoto – 65+35+270+370.
Peso molecular de 50 bp.



Exon 26. Tamanho do Amplicon: 250 pb, Wild type – 162+88,
Heterozigoto – 250+162+88 Mutante – 250 **Peso molecular de 100 bp**

Abaixo a técnica de sequenciamento direto do exon 21, mostrando o eletroferograma em que o perfil genético é caracterizado pelo pico. (sinalizado pela seta rosa)



Sequenciamento do DNA para visualização do polimorfismo do exon 21 c2677G>T verificada através do software Sequencher. 1: Paciente homozigoto selvagem com o genótipo GG. 2: Paciente heterozigoto com o genótipo GT. 3: Paciente homozigoto mutante com o genótipo TT.

A não-padronização do tratamento para estes pacientes possibilitará a redução da exposição do paciente a terapias prolongadas com baixa eficácia e muitas vezes onerosas. O tratamento personalizado, portanto, diminuirá o impacto econômico sobre o sistema de saúde relacionado a altas incidências de mortes e internações, devido à redução da ineficácia ou toxicidade.

9.REFERÊNCIAS

- AH, S. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics**, v. 36, n. 1, p. 9–13, 1998 1998.
- ALBERTS, B. et al Transporte de membrana de pequenas moléculas e as propriedades elétricas das membranas. **Biologia molecular da célula**.5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 11, p.651-694
- AMANTE, T. D.; AHMED, T. A. Risk factors for unsuccessful tuberculosis treatment outcome (failure, default and death) in public health institutions, Eastern Ethiopia. **The Pan African Medical Journal**, v. 20, 16 mar. 2015.
- AMBUDKAR, S. V. *et al.* Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 361–398, 1 abr. 1999.
- AMBUDKAR, S. V.; KIM, I.-W.; SAUNA, Z. E. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 392–400, abr. 2006.
- AMIN, M. L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. **Drug Target Insights**, v. 7, p. 27–34, 19 ago. 2013.
- BALLESTERO, J. G. DE A. *et al.* **Tuberculose multirresistente: integralidade da atenção à saúde na perspectiva discursiva**. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=127731659021>>. Acesso em: 13 mar. 2017.
- BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. Cellular Resistance to Actinomycin D in Chinese Hamster Cells in Vitro: Cross-Resistance, Radioautographic, and Cytogenetic Studies. **Cancer Research**, v. 30, n. 4, p. 1174–1184, 1 abr. 1970.
- BOEHME, C. C. *et al.* Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1005–1015, 9 set. 2010.
- Boletim da tuberculose 2014**, Disponível em: <<http://riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=wXJ%2BKouHyII%3D>>. Acesso em: 1 abr. 2017

Boletim epidemiológico tuberculose 2014. Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/29/BE-2014-45--2--tb.pdf>>.

Acesso em: 1 abr. 2017

Boletim epidemiológico Tuberculose. 2016 , Disponível em:

<<http://igovsp.net/spuksaude/wp-content/uploads/2017/03/2016-009-Tuberculose-001.pdf>>. Acesso em: 1 abr. 2017

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases**

Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed. [s.l.] AMGH Editora, 2012.

CASCORBI, I. Drug interactions--principles, examples and clinical consequences. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 109, n. 33–34, p. 546–555; quiz 556, ago. 2012.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. DE A. Etiologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 2, p. 24–26, 2006.

CUTHBERTSON, L.; KOS, V.; WHITFIELD, C. ABC Transporters Involved in Export of Cell Surface Glycoconjugates. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 341–362, 9 jan. 2010.

D, S. *et al.* Reversal of multidrug resistance of tumor cells. **Anticancer research**, v. 20, n. 6B, p. 4261–4274, 2000.

DANØ, K. Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 323, n. 3, p. 466–483, 25 out. 1973.

DEAN, M. ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 14, n. 1, p. 3–9, 1 mar. 2009.

EICHELBAUM, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; EVANS, W. E. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 119–137, 2006.

Farmacogenética -. Disponível em:

<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAYt0AH/farmacogenetica>>. Acesso em: 1 abr. 2017.

- FONTANA, V. F. V. *et al.* O conceito de gene está em crise. A farmacogenética e a farmacogenômica também? **Biotemas**, v. 19, n. 3, p. 87–96, 1 jan. 2006.
- FRANK, M. H. *et al.* Specific MDR1 P-Glycoprotein Blockade Inhibits Human Alloimmune T Cell Activation In Vitro. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 4, p. 2451–2459, 15 fev. 2001.
- FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 8, p. 423–429, ago. 2004.
- FUNG, K. L.; GOTTESMAN, M. M. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 5, p. 860–871, maio 2009.
- GLAVINAS, H. *et al.* The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. **Current Drug Delivery**, v. 1, n. 1, p. 27–42, jan. 2004.
- GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, jan. 2002.
- GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 385–427, 1 jun. 1993.
- HOFFMEYER, S. *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3473–3478, 28 mar. 2000.
- HUGHES, NULL. Genomic technologies in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 1, p. 6, jan. 1999.
- hypercholesterolemic individuals of European descent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 9, p. 1389–1397, set. 2005.
- In vitro and In vivo Relevance of the P-glycoprotein Probe Substrates in Drug Discovery and Development: Focus on Rhodamine 123, Digoxin and Talinolol. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, 20 ago. 2011.
- JR, S.; DA, J. B. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. S57–S86, jun. 2004.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 455, n. 1, p. 152–162, 11 nov. 1976.

KIM R, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:189-99.

LEE, W. *et al.* Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. **The Oncologist**, v. 10, n. 2, p. 104–111, fev. 2005.

LESPINE, A. *et al.* ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 293–298, jul. 2008.

LIN, J. H. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 1, p. 53–81, 21 jan. 2003.

MALINGRÉ, M. M. *et al.* Co-administration of GF120918 significantly increases the systemic exposure to oral paclitaxel in cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 1, p. 42–47, jan. 2001.

MANCINELLI, L.; CRONIN, M.; SADÉE, W. Pharmacogenomics: The promise of personalized medicine. **AAPS PharmSci**, v. 2, n. 1, p. 29–41, 7 mar. 2000.

Manual de recomendações para o controle da tuberculose no brasil 2011.pdf. ,

[s.d.]. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2017

MARCHETTI, S. *et al.* Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). **The Oncologist**, v. 12, n. 8, p. 927–941, 8 jan. 2007.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. FARMACOGENÉTICA: PRINCÍPIOS, APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 39, n. 4, p. 515–521, 30 dez. 2006.

MICHELETTI, V. C. D. *et al.* Drug-resistant tuberculosis in subjects included in the Second National Survey on Antituberculosis Drug Resistance in Porto Alegre, Brazil,. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 2, p. 155–163, abr. 2014.

NG, W. F. *et al.* Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 3, p. 1224–1232, mar. 1989.

OMS. Global tuberculosis report 2015. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2017

PFYFFER, G. E. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*. p. 536–569, 1 jun. 2015.

P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7468–7485, 2003.

PIRMOHAMED, M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 345–347, out. 2001.

Portal da Saúde/SUS-Tuberculose2016. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/operacional/ministerio/principal/secretarias/svs/tuberculose>>. Acesso em: 1 abr. 2017.

Programa Municipal de Controle da Tuberculose e Hanseníase | Portal Prefeitura de Dourados/2016. , [s.d.]. Disponível em:

<<http://www.dourados.ms.gov.br/index.php/programa-municipal-de-controle-da-tuberculose-e-hanseniose/>>. Acesso em: 1 abr. 2017

Programa nacional de controle da tuberculose- Ministerio da saude/2016.

Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/21/Apresentacao-sobre-os-principais-indicadores-da-tuberculose.pdf>>. Acesso em: 1 abr. 2017

RANG, R. *et al.* **Rang & Dale Farmacologia.** [s.l.] Elsevier Brasil, 2015.

ROCHA, J. L. R. *et al.* Tuberculose multirresistente. **Revista Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 17n. 1, p. 27-32, 2008. Disponível em:

<http://sopterj.com.br/profissionais/_educacao_continuada/curso_tuberculose_8.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2017

RODRIGUES, A. C. *et al.* High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian

Secretaria da saúde. Nota Técnica sobre as Mudanças no Tratamento da Tuberculose no Brasil para Adultos e Adolescentes 2011, [s.d.]. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1339785771_Nota%20T%C3%A9cnica%20sobre%20as%20Mudan%C3%A7as%20no%20Tratamento%20da%20Tuberculose%20no%20Brasil%20para%20Adultos%20e%20Adolescentes%20-%20Vers%C3%A3o%202.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2017

SHAROM, F. J. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? **The Journal of Membrane Biology**, v. 160, n. 3, p. 161–175, 1 dez. 1997.

SHAROM, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. **Essays in Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 161–178, 7 set. 2011.

SIEGSMUND, M. *et al.* Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 13, n. 7, p. 1847–1854, jul. 2002.

SILVA, R. *et al.* Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, p. 1–123, maio 2015.

SIQUEIRA, H. R. DE *et al.* O tratamento atual da tuberculose (para adolescentes e adultos) comentado. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 2, p. 61–71, 2010.

THIEBAUT, F. *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 21, p. 7735–7738, nov. 1987.

Tuberculose - Secretaria da Saúde. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=939>>. Acesso em: 1 abr. 2017.

VARMA, M. V. S. *et al.* P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 4, p. 347–359, out. 2003.

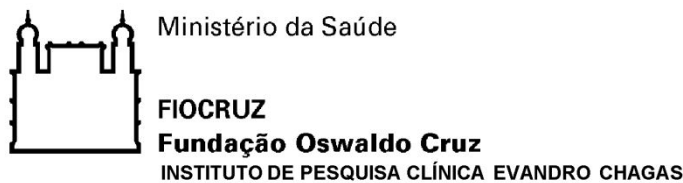
VILLA, T. C. S. *et al.* Coverage of directly observed treatment (DOTS) of tuberculosis in the State of São Paulo (1998-2004). **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 42, n. 1, p. 98–104, mar. 2008.

WEINSHILBOUM, R. M.; WANG, L. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 7, p. 223–245, 2006.

WESTPHAL, K. *et al.* Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, n. 4, p. 345–355, out. 2000.

YU, D. K. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, n. 12, p. 1203–1211, dez. 1999.

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DE ACORDO COM AS NORMAS DA RESOLUÇÃO Nº 196, DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DE 10 DE OUTUBRO DE 1996.

Projeto: Avaliação dos Polimorfismos do Gene MDR1 e sua Expressão (Glicoproteína-P) na Resistência ao Tratamento da Tuberculose

Pesquisadora Responsável: Liane de Castro, Bióloga, Doutora em Ciências.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre a influência de características genéticas humanas sobre o desenvolvimento de resistência aos medicamentos pela bactéria causadora da tuberculose. Sua participação não é obrigatória, mas **voluntária**. Você pode se recusar a participar da pesquisa ou, a qualquer momento, desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que este fato cause qualquer constrangimento ou penalidade. Cabe salientar que caso ocorra a sua retirada do estudo, esta não acarretará nenhum prejuízo ao seu tratamento e/ou acompanhamento no INI. Os pesquisadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, e também poderão interromper sua participação a qualquer tempo por razões técnicas ou médicas. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. **Antes de assinar este termo, você deve se informar plenamente sobre ele, fazendo todas as perguntas que ache necessário. Devendo ficar esclarecido (a) quanto às informações que se seguem:**

A) Neste estudo os pesquisadores irão comparar as variáveis de um gene que confere resistência aos medicamentos, entre pessoas que não respondem ao tratamento para a tuberculose e os que respondem ao tratamento.

B) Sua participação neste estudo poderá não trazer benefícios diretos para você, mas você estará contribuindo para aumentar os conhecimentos da reação do nosso organismo na resposta ao tratamento da tuberculose. Os resultados obtidos poderão contribuir para a melhora da qualidade do tratamento em outros indivíduos.

C) Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer uma amostra de sangue que será retirada da veia do seu braço, este procedimento será realizado no setor de coleta de sangue do INI. Você poderá ser convidado (a) a fornecer uma nova amostra de sangue, caso o material seja insuficiente ou sofra algum tipo de alteração (coagulação ou hemólise).

C) A coleta de sangue causará um pequeno desconforto (semelhante à picada de inseto), com pequena ardência no local da coleta. Este procedimento não implica nenhum risco, pois faz parte dos procedimentos de rotina para a coleta de sangue, podendo ocorrer pequenas manchas roxas (extravasamento de sangue da veia para o tecido) no local da punção. O sangue será coletado em tubo de vidro e agulhas descartáveis, num total de **05mL**.

D) O sangue coletado não será estocado com finalidades de biorrepositório.

E) Por participar dessa pesquisa, seus registros médicos serão usados como fonte de informação para a condução do estudo, mas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os resultados serão divulgados em apresentações ou publicações com fins científicos ou educativos, e sua identidade não será jamais exposta. O Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC pode ter acesso a meus registros.

F) Participar dessa pesquisa não implicará em nenhum custo para você, e, como voluntário, você não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela participação, a não ser auxílio transporte no (s) dia (s) em que comparecer à Fiocruz para as atividades do projeto.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço da pesquisadora responsável, podendo tirar dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou em qualquer momento.

Pesquisadora Responsável: Liane de Castro

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Av. Brasil 4365, Pavilhão Maria Deane, Laboratório de Pesquisa em Farmacogenética.

Telefones (21) 3865-9558 das 08 às 17 horas.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento livre e esclarecido do paciente participante da pesquisa

“Eu li ou ouvi a leitura da descrição dessa pesquisa que está sendo desenvolvida na Fiocruz, como exposto acima. A pesquisadora ou seu representante me explicou o estudo e respondeu a todas as minhas perguntas naquele momento, e me esclareceu quanto aos benefícios e riscos do estudo. Fui informado (a) de que dados confidenciais envolvidos na pesquisa serão tratados com sigilo e privacidade e que não terei qualquer despesa com minha participação. Estou ciente que este estudo não me beneficiará diretamente. Sei também que tenho garantia de que poderei interromper minha participação ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem punição alguma e sem prejuízo à minha assistência. Se recusar a participar ou se mais tarde eu desistir de participar da pesquisa isso não afetará negativamente meu acompanhamento médico posterior. Declaro livremente estar sendo voluntário (a) da para participar dessa pesquisa.

Declaro que entendi os objetivos da pesquisa, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo participar voluntariamente, sabendo que sou livre para deixar de participar a qualquer momento, recebendo cópia deste termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando ciente ainda que outra cópia permanecerá registrada nos arquivos do Laboratório de Pesquisa em Farmacogenética do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas”.

Rio,

 ____/____/____

Assinatura do Paciente.

_____ telefone p/ contato:

 Endereço

_____ Rio, ____/____/____

 Assinatura da Testemunha

Rio, ___/___/___

Assinatura do Médico Representante

Rio, ___/___/___

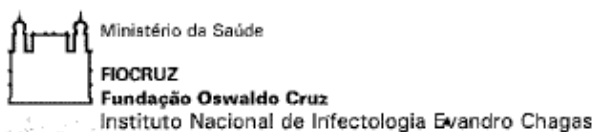
Assinatura do Pesquisador Principal

Iniciais: _____

Data da assinatura _____

Termo de Consentimento Livre e
Esclarecido

ANEXO 2: Aprovação do CEP



Rio de Janeiro, 06 de novembro de 2015.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC

Para: Dra. Liane de Castro

Prezada Dra. Liane,

Com referência ao projeto **"Avaliação dos Polimorfismos do Gene MDR-1 no Desfecho do Tratamento da Tuberculose"**, objeto de estudo da mestranda Yasmin de Oliveira Pontual visa a cumprir todos os objetivos propostos no projeto intitulado **"Avaliação dos Polimorfismos Gene MDR-1 e sua Expressa (Glicoproteína-P) na Resistência ao Tratamento da Tuberculose"**, aprovado pelo CEP/INI sob o protocolo n° 0048.0.009.000-09 em 19/08/2009, que foi objetivo de doutorado no mesmo Programa de Pós-graduação (INI), mas que devido a problemas operacionais não foi possível realizar a investigação dos polimorfismos, sendo executado apenas a análise da expressão gênica.

Esta documentação foi apreciada e aprovada por esta Coordenação (Relatora) na presente data; o projeto da mestranda deverá ser continuado para terminar os objetivos propostos no projeto inicial.

Atenciosamente,



Dr^a Léa Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ