

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MÁRCIA QUINHONES PIRES LOPES

Avaliação dos fenótipos de acetilação e hidroxilação predominantes nas populações de cinco macrorregiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador:

Dr. Adalberto Rezende Santos
Pesquisador Titular – Lab. de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias - IOC
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro
Março de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

L864 Lopes, Márcia Quinhones Pires

Avaliação dos fenótipos de acetilação e hidroxilação predominantes nas populações de cinco macrorregiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase / Márcia Quinhones Pires Lopes. – Rio de Janeiro, 2015.

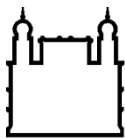
xx, 130 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 94-119

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Hanseníase. 3. Epidemiologia Molecular. 4. Proteínas metabolizadoras de drogas. 5. Polimorfismo genético. 6. Farmacogenética. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MÁRCIA QUINHONES PIRES LOPES

Avaliação dos fenótipos de acetilação e hidroxilação predominantes nas populações de cinco macrorregiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase

Orientador:

Dr. Adalberto Rezende Santos

Data da Aprovação: 03/03/2015

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Dra. Patrícia Cuervo Escobar (Presidente)

Dra. Giselda Maria Kalil de Cabello

Dra. Maria Eugênia Novinski Gallo

SUPLENTES:

Dr. Antônio Basílio de Miranda

Dra. Cynthia Chester Cardoso

Rio de Janeiro, 03 de março de 2015.

*Dedico este trabalho as duas grandes razões da minha vida:
Aos meus filhos Tiago e Diogo.*

“A minha família, com carinho.”

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas, é quem faz as verdadeiras perguntas”

Claude Lévi-Strauss

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Martin Luther King

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me mostrado o caminho, ter me dado força e saúde e colocado às pessoas certas na minha vida.

A meus pais por sempre terem me mostrado que com honestidade, força e determinação podemos realizar nossos maiores sonhos.

Ao chefe do laboratório Dr. Philip Noel Suffys pelo apoio e confiança em todos os momentos, principalmente pelo apoio financeiro para execução deste trabalho. Serei eternamente grata.

Ao meu orientador Dr. Adalberto Rezende Santos que além de ser um grande amigo, é um exemplo de simplicidade, humildade e determinação. Me mostrou que com gestos simples, objetivos e sabedoria podemos obter grandes realizações, além de ter depositado em mim toda confiança e me dar todo apoio para que pudesse realizar este trabalho.

A minha amiga e filha Raquel por todo o carinho e apoio que sempre me depositou a qual eu responsabilizo por esta conquista e pela grande decisão na minha vida de lutar pelas coisas que eu achava importante e sem a qual eu não teria chegado até aqui. Muito, muito, obrigada. Uma das pessoas que todos os dias eu agradeço a Deus por ter colocado na minha vida. Amo você!

As Dras. Maria Eugênia e Maria Leide por ter acreditado neste projeto e fazê-lo acontecer.

Aos meus filhos que por tantas vezes foram deixados em segundo plano e se privaram do convívio familiar e lazer, mas com paciência sempre compreenderam e me apoiaram. Amo vocês.

Ao meu marido Paulo Roberto que conseguiu aturar minhas angústias e me socorreu quando precisei. Obrigada por tudo.

Ao meu amigo Antônio Basílio pela amizade, paciência e orientação principalmente na execução do PHASE em que vinha me socorrer e solucionar os problemas que surgiam no caminho. Muito obrigada por tudo!

A minha amiga Lizânia, pelo apoio principalmente no início deste trabalho em que podia dividir minhas aflições e horas de lazer com nossas idas ao cinema.

Ao amigo Kleyton pela grande ajuda em parte experimental desta tese e solicitude em todos os momentos. Muito obrigada!

Ao amigo Rafael Santos pela grande ajuda e organização na parte inicial da tese, sem a qual teria sido mais difícil. Obrigada por tudo!

Ao meu amigo e psicólogo Harrison pelo incentivo sempre e todo apoio nos principais momentos. Muito obrigada de tê-lo como amigo.

A minha amiga Amanda pelo apoio e ajuda valiosa em vários momentos, principalmente na fase final da tese em que tive que dividir minha aflição com outras responsabilidades e sem a sua ajuda não teria sido possível. Obrigada por ter me apoiado e pelos altos papos trocados em nosso convívio diário. Amo você!

A minha querida irmã Marize, que mesmo com suas aflições conseguiu me socorrer e pude contar com sua ajuda em mais esta empreitada. Amo você!

Ao amigo Jorge Luís pela presteza e cordialidade em todos os momentos. Obrigada por tudo.

Ao pessoal do ASA, José Augusto, Ana Salles, Roberta Lemos, Nádia Duppre, Valcemir e Lucia Helena pela solicitude e carinho com que me trataram quando precisei de ajuda na seleção e obtenção das amostras do Rio de Janeiro.

Ao Dr. Pedro H. Cabello pela solicitude e grande ajuda na parte estatística desta tese. Obrigada!

A todos os profissionais de saúde que colaboraram com este projeto, desde a seleção das amostras até o envio das mesmas. Muito obrigada!

A todos os pacientes que concordaram em participar do estudo e sem o qual este não seria possível. Obrigada!

Aos amigos do Lab pelo convívio e por poder compartilhar todos os momentos bons e ruins, que graças a Deus foram em sua maioria bons, principalmente em nossas comemorações com café da manhã.

A todos os amigos da Hanseníase que direta ou indiretamente puderam compartilhar de todos os momentos desta tese (Não citarei nomes porque são muitos), mas em especial a Cristiane, Augusto, Andréa e Jean que estão sempre prontos para ajudar no que for preciso.

Aos amigos do antigo DBBM que sempre estavam prontos a ajudar no que fosse preciso, principalmente a Aline, Leonardo, Renata, Marcelo e Beatriz.

A minha amiga inesquecível de todas as horas e que sempre está pronta para ajudar no que for preciso, a eterna Dona Neiva.

A plataforma PDTIS/sequenciamento/Fiocruz.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1.1: Epidemiologia da hanseníase no mundo e no Brasil.....	3
Figura 1.2: Cartela para esquema de tratamento para pacientes paucibacilares..	4
Figura 1.3: Cartela para esquema de tratamento para pacientes multibacilares..	5
Figura 1.4: Cartela para esquema de tratamento para crianças paucibacilares....	6
Figura 1.5: Cartela para esquema de tratamento para crianças multibacilares....	6
Figura 1.6: Efeito dos fármacos e a relação com as variáveis farmacocinética, farmacodinâmica e local onde ocorre a variabilidade biológica.....	9
Figura 1.7: Reações de biotransformação de fármacos.....	10
Figura 1.8: Estrutura da dapsona.....	12
Figura 1.9: Vias metabólicas da dapsona em humanos.....	14
Figura 1.10: Localização cromossômica dos <i>loci</i> das N-acetiltransferases humanas.....	27
Figura 1.11: Nomeando uma isoenzima do citocromo P450.....	31
Figura 1.12: Localização dos polimorfismos no <i>locus</i> de <i>CYP2E1</i> e as respectivas enzimas de restrição utilizadas para detectar os diferentes genótipos.....	33
Figura 1.13: Distribuição das mutações no gene <i>CYP3A4</i>	36
Figura 1.14: Distribuição das mutações no gene <i>CYP3A5</i>	39
Figura 4.1 (A) e (B): Ilustração da utilização do Software v.2.5. Identificação de variantes na sequência.....	50
Figura 4.2: Ilustração da utilização do Software v.2.5. Alinhamento das sequências obtidas com a sequência referência.....	50
Figura 4.3: Identificação de SNPs através da visualização do cromatograma dentro do programa SeqScape.....	51
Figura 4.4 A e B: Estratégia de amplificação do gene <i>CYP3A5</i> *3 e *6 e representação esquemática do perfil de digestão com enzima DdeI após corrida em gel de poliacrilamida 15% (PCR-RFLP).....	53
Figura 5.1: Frequência de anemia hemolítica nos pacientes com hanseníase, dos diferentes estados, incluídos neste estudo.....	57

Figura 5.2: Gel de agarose 1% mostrando extração de DNA genômico humano a partir de sangue total utilizando o kit “QIAamp - Quiagen”.....	58
Figura 5.3: Distribuição das frequências dos sete principais SNPs de <i>NAT2</i>	59
Figura 5.4: Perfil de acetilação na população brasileira.....	64
Figura 5.5: Gel de agarose 2%. Perfil de digestão (<i>Rsa</i> I) dos três genótipos de <i>CYP2E1</i> para o SNP -1053 C→T.....	66
Figura 5.6: Distribuição dos genótipos de <i>CYP2E1</i> em 4 macrorregiões do Brasil.....	67
Figura 5.7: Gel de poliacrilamida 15%. Perfil de digestão (<i>Dde</i> I) dos três genótipos de <i>CYP3A5*3</i>	68
Figura 5.8: Gel de poliacrilamida 15%. Perfil de digestão (<i>Dde</i> I) dos três genótipos de <i>CYP3A5*6</i>	68
Figura 5.9: Distribuição dos genótipos de <i>CYP3A5*3</i> em 4 macrorregiões do Brasil.....	70
Figura 5.10: Distribuição dos genótipos de <i>CYP3A5*6</i> em 4 macrorregiões do Brasil.....	70
Figura 5.11: Gel de agarose 1,5% com produtos da PCR de <i>CYP3A4*1B</i>	71
Figura 5.12: Distribuição dos genótipos de <i>CYP3A4*1B</i> em 4 macrorregiões do Brasil.....	72
Figura 5.13: Gráfico contendo a proporção de casos obtidos pela partição do χ^2 da análise <i>NAT2 / CYP2E1</i>	76
Figura 5.14: Gráfico contendo a proporção de casos obtidos pela partição do χ^2 da análise <i>NAT2 / CYP3A5*3</i>	78
Figura 5.15: Gráfico contendo a proporção de casos obtidos pela partição do χ^2 da análise <i>NAT2 / CYP3A5*6</i>	79
Figura 5.16: Gráfico contendo a proporção de casos obtidos pela partição do χ^2 da análise <i>NAT2 / CYP3A4*1B</i>	80

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1: Esquema de tratamento para crianças paucibacilares.....	5
Tabela 1.2: Esquema de tratamento para crianças multibacilares.....	6
Tabela 1.3: Esquema de tratamento alternativo.....	7
Tabela 1.4: Tipos de efeitos adversos induzidos pela dapsona.....	18
Tabela 4.1: N amostral e dados demográficos por município, estado e região....	45
Tabela 4.2: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de <i>NAT2</i>	47
Tabela 4.3: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de <i>CYP3A4*1B</i>	52
Tabela 4.4: Iniciadores utilizados para amplificação da variante alélica <i>CYP3A5*3</i>	54
Tabela 4.5: Iniciadores utilizados para amplificação da variante alélica <i>CYP3A5*6</i>	54
Tabela 4.6: Iniciadores utilizados para amplificação de parte da região promotora de <i>CYP2E1</i>	55
Tabela 5.1: Distribuição e descrição demográfica dos pacientes entre os estados e regiões para cada gene.....	56
Tabela 5.2: Descrição dos diferentes tipos de ADRs identificados neste estudo.....	57
Tabela 5.3: Frequência alélica dos SNPs da região codificante de <i>NAT2</i> encontrados na população de estudo.....	60
Tabela 5.4: Frequência dos principais haplótipos de <i>NAT2</i> encontrados com frequência acima de 1% em pelo menos um estado.....	62
Tabela 5.5: Frequências dos genótipos de <i>NAT2</i> encontrados na população estudada (Anexo 4).....	126
Tabela 5.6: Frequências dos diferentes perfis fenotípicos de acetilação em cinco diferentes macrorregiões do Brasil.....	63
Tabela 5.7: Frequências dos genótipos e alelos de <i>CYP2E1</i> por estado e região.	67
Tabela 5.8: Frequências dos genótipos e alelos de <i>CYP3A5*3</i> por estado e região.....	69
Tabela 5.9: Frequências dos genótipos e alelos de <i>CYP3A5*6</i> por estado e região.....	69

Tabela 5.10: Frequências dos genótipos e alelos de <i>CYP3A4*1B</i> por estado e região.....	72
Tabela 5.11: Distribuição e descrição demográfica dos pacientes entre os estados e regiões.....	73
Tabela 5.12: Influência dos genótipos/fenótipos de <i>NAT2</i> e <i>CYP450</i> na ocorrência de ADRs na hanseníase durante tratamento com dapsona.....	75
Tabela 5.13: Análise da interação gene-gene no efeito das reações adversas hematológicas.....	81

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADRs	Reações Adversas a Drogas
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
CYP	Citocromo P450
CFZ	Clofazamina
DDS	4-4'diaminodifenilsulfona - dapsona
DADDS	Diacetildapsona
DNA	Ácido desoribonucléico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato (N= A, C, G ou T)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GSH	Glutaciona (forma reduzida)
GSSG	Glutaciona oxidada (forma dimerizada da GSH)
GST	Glutaciona S-transferase
GT	Glucuronosiltransferase
Hb	Hemoglobina
HR	Reações de hipersensibilidade
IC	Intervalo de confiança
Indels	Inserções / deleções de bases
MB	Multibacilar
MS	Ministério da Saúde
Met-Hb	Metemoglobina
MADDS	Monoacetildapsona
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NAT2	N-acetiltransferase 2
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ration
PB	Paucibacilar
pb	Par (es) de base (s)
PQT	Poliquimioterapia
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação de polimerização em cadeia)

RFM	Rifampicina
RFLP	<i>Restriction fragment lengt polymorphisms</i>
ROM	Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
TAE	Tris-Acético-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishidroximetilamino metano
UDPGA	uridina 5'-difosfo-ácido glucorônico
UV	Ultravioleta
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

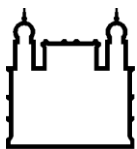
SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
1.1- Hanseníase.....	1
1.2- Transmissão.....	1
1.3- Epidemiologia da hanseníase.....	2
1.4- Tratamento.....	4
1.4.1- Esquema paucibacilar (PB).....	4
1.4.2- Esquema multibacilar (MB).....	4
1.4.3- Esquema de tratamento para crianças.....	5
1.4.4- Esquema alternativo.....	6
1.5- A biotransformação e ação terapêutica de drogas.....	8
1.6- Dapsona e toxicidade.....	11
1.6.1- Histórico.....	11
1.6.2- Estrutura química da dapsona.....	12
1.6.3- Farmacocinética da dapsona.....	13
1.6.3.1- Absorção.....	13
1.6.3.2- Distribuição.....	13
1.6.3.3- Metabolização e excreção.....	13
1.6.3.3.1- Acetilação.....	14
1.6.3.3.2- Hidroxilação.....	15
1.6.4- Efeitos adversos.....	17
1.6.4.1- Efeitos hematológicos.....	18
1.6.4.1.1- Hemólise.....	18
1.6.4.1.2- Meta-hemoglobinemia.....	19
1.6.4.1.3- Agranulocitose.....	19
1.6.4.2- Hepatotxicidade.....	20
1.6.4.3- Síndrome de hipersensibilidade a dapsona.....	20
1.6.4.4- Efeitos neurológicos.....	20
1.7- A genética na farmacologia.....	21
1.7.1- Farmacogenética: Considerações na sua aplicação à terapia	

medicamentosa.....	23
1.7.2- Farmacogenética e biotransformação da dapsona.....	24
1.8- N-acetiltransferase.....	24
1.8.1- Genética molecular NAT2.....	26
1.9- CYP 450.....	29
1.9.1- Nomenclatura.....	30
1.9.2- Genética molecular da mono-oxigenase CYP2E1.....	32
1.9.3- Subfamília CYP3A.....	34
1.9.3.1- Genética molecular da mono-oxigenase CYP3A4.....	35
1.9.3.2- Genética molecular da mono-oxigenase CYP3A5.....	38
2. Justificativa.....	41
3. Objetivos.....	43
3.1- Objetivos Gerais.....	43
3.2- Objetivos Específicos.....	43
4. Pacientes e Métodos.....	44
4.1- Delineamento do Estudo.....	44
4.2- Período de Estudo.....	44
4.3- Local de Estudo.....	44
4.3.1- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz - IOC/ Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias.....	44
4.3.2- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - IOC / Lab. de Genômica Funcional e Bioinformática/ Plataforma de sequenciamento.....	44
4.3.3- Fundação Oswaldo Cruz - IOC / Laboratório de Hanseníase/ Ambulatório Souza Araújo	44
4.3.4- Demais Unidades de Saúde.....	45
4.4- Critérios de elegibilidade.....	45
4.4.1- Critérios de inclusão.....	46
4.4.2- Critérios de exclusão.....	46
4.5- Coleta e processamento das amostras.....	46
4.6- Aspectos éticos.....	46

4.7- Suporte financeiro.....	46
4.8- Metodologia.....	47
4.8.1- Extração de DNA genômico.....	47
4.8.2- N-acetiltransferase 2 (NAT2).....	47
4.8.2.1- Condições de amplificação <i>NAT2</i>	48
4.8.2.2- Eletroforese em gel de agarose.....	48
4.8.2.3- Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento com <i>Kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up</i> (Invitrogen).....	48
4.8.2.4- Sequenciamento automatizado.....	49
4.8.2.5- Análise das sequências e identificação dos SNPs presentes na região codificante do gene <i>NAT2</i>	49
4.8.2.6- Tabulação dos dados e caracterização dos haplótipos através do software PHASE 2.1.1.....	51
4.8.2.7- Análise estatística.....	52
4.8.3- <i>CYP3A4*1B</i>	52
4.8.4- <i>CYP3A5</i>	52
4.8.4.1- Condições de amplificação do gene <i>CYP3A5*3</i>	53
4.8.4.2- Condições de digestão <i>CYP3A5*3/Dde I</i>	54
4.8.4.3- Condições de amplificação do gene <i>CYP3A5*6</i>	54
4.8.4.4- Condições de digestão <i>CYP3A5*6/Dde I</i>	55
4.8.5- <i>CYP2E1</i>	55
5. Resultados.....	56
5.1- Pacientes: características sócio-demográficas e clínicas.....	56
5.2- Estudo descritivo.....	58
5.2.1- Extração de DNA genômico a partir de sangue total	58
5.2.2- Genotipagem e análise do perfil genético de <i>NAT2</i>	58
5.3- Inclusão de outros genes envolvidos no metabolismo da dapsona.....	65
5.3.1- <i>CYP2E1</i>	66
5.3.2- <i>CYP3A5</i> (*3 e *6).....	68
5.3.3- <i>CYP3A4*1B</i>	71
5.4- Estudo de associação.....	73
5.4.1- Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e teste de homogeneidade entre os	

perfis de acetilação de NAT2 e a variabilidade genética dos Citocromos P450 avaliados neste estudo.....	74
5.4.1.1- NAT2.....	74
5.4.1.2- CYP2E1.....	74
5.4.1.3- CYP3A5*3, CYP3A5*6 e CYP3A4*1B.....	75
5.4.2- Estudo das reações adversas.....	75
5.4.2.1- NAT2 / CYP2E1	76
5.4.2.2- NAT2 / CYP3A5*3	77
5.4.2.3- NAT2 / CYP3A5*6.....	78
5.4.2.4- NAT2 / CYP3A4*1B.....	79
6. Discussão.....	82
6.1- O tratamento da hanseníase e suas aplicações.....	82
6.2- Influência da variabilidade genética na ocorrência de ADRs na hanseníase.....	83
6.2.1- Variabilidade genética do gene NAT2 no Brasil.....	83
6.2.2- Variabilidade genética de CYP2E1 no Brasil.....	86
6.2.3- Variabilidade genética dos genes da família CYP3A.....	87
6.3- Estudo de associação.....	88
7. Conclusões.....	92
8. Perspectivas futuras.....	93
9. Relevância do estudo	93
10. Bibliografia.....	94
11. Anexos.....	120



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

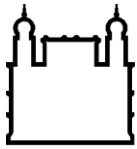
Avaliação dos fenótipos de acetilação e hidroxilação predominantes nas populações de cinco macrorregiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Márcia Quinhones Pires Lopes

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, com alto poder incapacitante. O tratamento se baseia na combinação de três drogas: dapsona, rifampicina e clofazimina, porém, a ocorrência de reações adversas (ADRs) induzidas principalmente pela dapsona (~70%) é frequentemente observada. Dentre as ADRs destacam-se: a metemoglobinemia, anemia hemolítica, a hepatite e a síndrome da dapsona. A metabolização da dapsona é baseada em reações enzimáticas de acetilação e hidroxilação, catalisadas, pelas enzimas N-acetiltransferase2 (NAT2) e hidroxilases do citocromo P450 (CYPs). Dentre os vários fatores associados à ocorrência de ADRs, o fator genético é primordial. Polimorfismos presentes em genes que codificam para enzimas metabolizadoras de drogas podem representar alto risco para este desfecho. Paralelamente, outro aspecto importante é a alta variabilidade genética ligada à etnia. O Brasil é um país composto por uma população altamente miscigenada com alta diversidade genética. Sendo a hanseníase uma doença endêmica tratada com um esquema padronizado para toda a população, a avaliação destes perfis genéticos é de fundamental relevância para a prevenção de ADRs. Este estudo teve como principal objetivo descrever a variabilidade dos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *CYP3A4* e *CYP3A5* em coortes de pacientes de hanseníase provenientes das cinco diferentes macrorregiões do Brasil e realizar um estudo de associação, do tipo caso-controle, entre as variáveis genéticas presentes nesses genes com a ocorrência de reações adversas em pacientes com hanseníase em tratamento com esquemas contendo dapsona. Um total de 964 indivíduos foram incluídos no estudo descritivo de *NAT2* enquanto para o estudo de associação variou dependendo da região. Vinte e três SNPs de *NAT2*, foram identificados nas populações estudadas, dos quais sete: 191 G>A; 282 C>T; 341T>C; 481 C>T; 590 G>A; 803 A>G e 857 G>A, são os mais frequentes na população mundial. Os resultados mostraram uma predominância de alelos *NAT2* associados com acetilação lenta porém variando de acordo com a região estudada. De forma semelhante, após genotipagem dos genes da família CYP450, foi observado que as frequências alélicas e genotípicas também variaram ao longo de todo território brasileiro. Os resultados mostraram que pacientes hansenianos com perfil de acetilação lenta e de hidroxilação rápida (*CYP2E1*), avaliados separadamente demonstraram uma associação com a ocorrência de ADRs, porém com Razões de Chance menores (2,4 e 1,9) que na análise combinada (4,08 para *CYP2E1*). Os perfis de hidroxilação rápida caracterizada pela presença dos alelos *CYP3A5*3*, *CYP3A5*6* e *CYP3A4*1B* analisados separadamente não apresentaram associação com a ocorrência de ADRs, porém na análise combinada com o perfil de acetilação lenta, observou-se uma forte associação com este desfecho representada pelas ORs (6,4 para *CYP3A5*3*; 4,83 para *CYP3A5*6* e 2,84 para *CYP3A4*1B*) sugerindo que a combinação entre os perfis fenotípicos de acetilação lenta com hidroxilação rápida representam o algoritmo ideal para uma proposta de teste preditivo a ser utilizado como suporte no tratamento da hanseníase com esquema contendo DDS.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of acetylation and hydroxylation phenotypes predominant in the populations of five geographical regions of Brazil based on the genome: possible influence of pharmacogenetics in the therapeutic management of leprosy

ABSTRACT

PhD thesis

Márcia Quinhones Pires Lopes

Leprosy is a chronic infectious disease with high disabling potential. The treatment is based on the combination of three drugs: dapsone, rifampicin and clofazimine, however, the occurrence of adverse drug reactions (ADRs) mainly induced by dapsone (~70%) is frequently observed with a predominance of methemoglobinemia, hemolytic anemia, hepatitis and dapsone syndrome. The dapsone metabolism is mediated by acetylation and hydroxylation enzymatic reactions catalyzed by the N-acetyltransferase 2 (NAT2) and cytochrome P450 (CYPs). Among the various factors associated with the occurrence of ADRs, the genetic factor is essential. Polymorphisms in genes encoding drug metabolizing enzymes may represent a high risk for this outcome. In parallel, another important aspect is the high genetic variability related to ethnicity. Brazil is composed of a high mixed population with high levels of genetic diversity. Being leprosy is an endemic disease which treatment is a standard regimen for the entire population, the evaluation of these genetic profiles became relevant for prevention of ADRs. The main goals of this study was to describe the genetic variability of *NAT2*, *CYP2E1*, *CYP3A4* and *CYP3A5* in cohorts of leprosy patients from five Brazilian geographical regions and to perform an association study (case-control) between the genetic variants present in these genes and occurrence of ADRs in leprosy patients treated with dapsone-containing schemes. A total of 964 individuals were enrolled to the descriptive study for *NAT2* while for the association study the sample size varied according to the region. Twenty-three SNPs in *NAT2*, were identified in the study population, seven of which 191 G> A; 282 C> T; 341T> C; 481 C> T; 590 G> A; 803 A> G and 857 G>A are the most frequent in the world population. The results showed a predominance of the *NAT2* alleles associated with slow acetylation however, varying according to the studied region. Similarly, after genotyping of CYP450 gene family, an allele and genotype frequency variation was also observed over Brazil. The results showed that leprosy patients with slow acetylation and rapid hydroxylation profile (*CYP2E1*), evaluated separately showed an association with the occurrence of ADRs, but with lower Odds ratios (2.4 and 1.9) than that observed in combined analysis (4.08 *CYP2E1*). The fast hydroxylation profile characterized by the presence of *CYP3A5**3, *CYP3A5**6 and *CYP3A4**1B, analyzed separately did not showed association with the occurrence of ADRs, however, the combined analysis with *NAT2* slow acetylation profile showed a strong acetylation with this outcome represented by the ORs (6.4 for *CYP3A5**3; 4.83 for *CYP3A5**6 and 2.84 for *CYP3A4**1B) suggesting that the combination of slow acetylation with fast hydroxylation phenotypes represent the ideal algorithm for a predictive test to be used as a support for leprosy treatment with DDS-containing regimen.



1. Introdução

1.1- A Hanseníase

Também conhecida como lepra ou mal de Lázaro, a hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de evolução lenta, que se manifesta principalmente através de sinais e sintomas dermatoneurológicos: lesões na pele e nos nervos periféricos, principalmente nos olhos, mãos e pés. A hanseníase tem como agente etiológico *Mycobacterium leprae*, parasito com tropismo para os filetes nervosos periféricos com consequente predominância de acometimento dos nervos periféricos podendo também manifestar-se por lesões cutâneas e distúrbios neurológicos. Após a infecção, o quadro clínico pode evoluir de acordo com o grau de suscetibilidade específica e individual (genética e imunológica) do paciente, seja para a regressão espontânea, seja para o agravamento progressivo. Nestes casos, podemos observar um comprometimento gradual da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, vísceras abdominais, linfonodos, medula óssea, testículos e ovários, causando sérias incapacidades físicas e sociais (Gallo *et al.*, em Coura *et al.*, 2005). O tempo de geração do bacilo é extremamente lento comparado com outras bactérias, variando entre 11 e 16 dias o que reflete no longo período de incubação (tempo desde a infecção até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas) da hanseníase, que varia de 5 a 7 anos em média. (Portaels, 1988).

De acordo com as características clínicas, histopatológicas e imunológicas, a hanseníase se apresenta em forma espectral, apresentando, de acordo com a classificação de Ridley & Jopling, duas formas polares, a forma lepromatosa-lepromatosa (LL), que apresenta pouca ou nenhuma imunidade celular e uma alta imunidade humoral, consequentemente com uma alta carga bacilar, e a forma tuberculóide-tuberculóide, que apresenta pouca ou nenhuma imunidade humoral e uma alta resposta celular, consequentemente com uma baixa carga bacilar (Ridley & Jopling, 1962). Para fins operacionais e de tratamento, as mesmas são classificadas como formas multibacilares e paucibacilares respectivamente. Adicionalmente, a hanseníase apresenta ainda três formas intermediárias classificadas como “borderline”, divididas em: a) *borderline-borderline* (BB), b) *borderline-tuberculóide* (BT) e c) *borderline-lepromatosa* (BL).

1.2- Transmissão

Cada passo da cadeia de infecção, desde a exposição ao *M. leprae*, passando pelo estabelecimento da infecção subclínica, até o desenvolvimento da doença, é determinado por um número de fatores de risco, os quais compreendem fatores ambientais e fatores genéticos.



Tendo em vista o longo período de incubação da hanseníase o completo entendimento sobre sua transmissão é um capítulo ainda não totalmente elucidado. Contudo, hoje entende-se que a mesma ocorre através do contato íntimo e prolongado com pacientes das formas multibacilares não tratadas, ou pelo contato direto com solução de descontinuidade da pele dos mesmos (Worobec MS, 2012).

Desta forma, em ordem decrescente, o risco de contrair a doença evolui de contatos domiciliares de pacientes das formas multibacilares até os contatos extra-domiciliares de pacientes das formas paucibacilares, indicando que o risco de desenvolvimento da doença varia de acordo com o grau de contato e com a carga bacilar da fonte de infecção.

A manifestação clínica da hanseníase depende, dentre outros fatores, da relação parasita / hospedeiro. Além dos fatores inerentes ao paciente, outros como os níveis da endemia, as condições sócio-econômicas desfavoráveis, as condições precárias de vida e de saúde e o elevado número de pessoas convivendo em um mesmo ambiente influenciam no risco de desenvolver a doença.

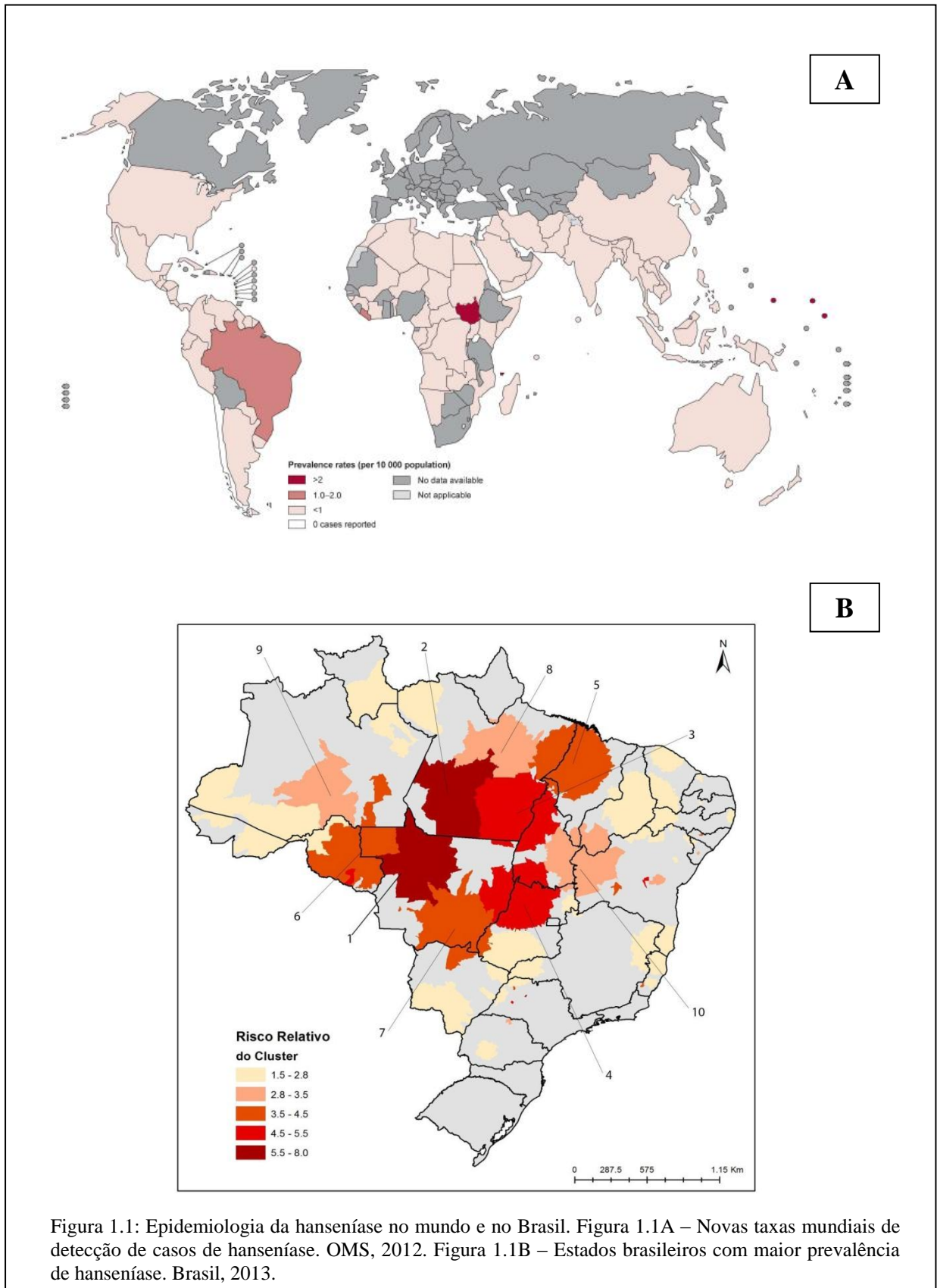
1.3- Epidemiologia da hanseníase

A razão de prevalência mundial de hanseníase foi estimada em 0,32 por 10.000 habitantes, no primeiro trimestre de 2014 (180.618 casos registrados), mostrando uma pequena queda em relação ao número de casos detectados em 2013 (189.018) (<http://www.who.int/lep/en>). A figura 1.1A mostra como os casos registrados estão distribuídos entre vários países. Países como Índia, Brasil, Indonésia, Etiópia, Nigéria e Nepal continuam com uma alta prevalência de casos (<http://www.who.int/lep/en>).

No Brasil, em 2013, a taxa de prevalência registrada foi de 1,42 casos para cada 10.000 habitantes enquanto o levantamento preliminar do Ministério da Saúde (MS) indica que em 2014 houve registros de 24.612 casos novos e identificados 1,56 casos novos por cada 10.000 habitantes, mostrando um aumento da taxa de prevalência em relação ao ano anterior. Embora o Brasil registre decréscimos contínuos nos coeficientes de prevalência e de detecção de casos novos de hanseníase, a ocorrência é irregular, com presença em todos os estados, mas com grande concentração na Amazônia e estados do Nordeste. O mais endêmico é Mato Grosso com 9,03 casos/10000 habitantes. Em seguida Maranhão com 5,29 casos/10000 habitantes, em terceiro lugar Tocantins e em quarto o Pará com 4,28 e 3,69 casos/10000 habitantes respectivamente. Sendo assim, apesar da importante redução do coeficiente de prevalência de hanseníase no Brasil, algumas regiões demandam intensificação das ações para eliminação da



doença, justificadas por um padrão de alta endemicidade (Figura 1.1B) (WHO, Leprosy Today, 2014; DATASUS, 2014).





1.4- Tratamento

A poliquimioterapia é administrada através de esquema-padrão, de acordo com a classificação operacional do doente em paucibacilar (casos com até cinco lesões de pele) ou multibacilar (casos com mais de cinco lesões de pele). A informação sobre a classificação do doente é fundamental para selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso.

Para crianças com hanseníase, a dose dos medicamentos do esquema-padrão é ajustada, de acordo com sua idade. No caso de pessoas com intolerância a um dos medicamentos do esquema-padrão, são indicados esquemas alternativos (Worobec SM, 2012).

1.4.1- Esquema Paucibacilar (PB)

Para pacientes paucibacilares, o tratamento consiste na combinação de rifampicina e dapsona, acondicionadas numa cartela, no seguinte esquema:

- ✓ Rifampicina: uma dose mensal de 600mg (duas cápsulas de 300mg) com administração supervisionada,
- ✓ Dapsona: uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária auto-administrada. A duração do tratamento é de seis doses mensais supervisionadas de rifampicina e o critério de alta consiste em seis doses supervisionadas em até nove meses (Figura 1.2).

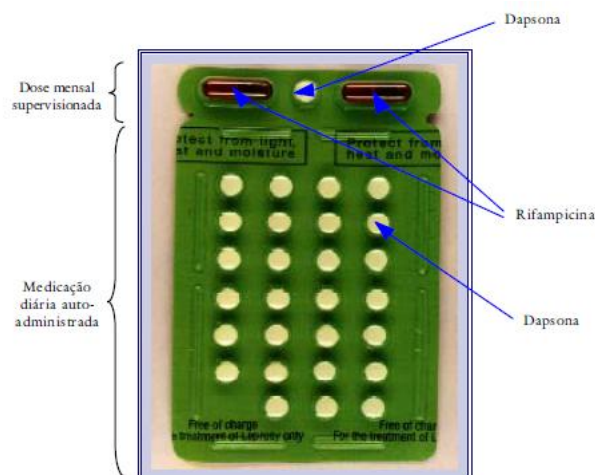


Figura 1.2: Cartela para esquema de tratamento para pacientes paucibacilares

1.4.2- Esquema Multibacilar (MB)

Para pacientes multibacilares, o tratamento é realizado com uma combinação de rifampicina, dapsona e clofazimina, acondicionadas numa cartela no seguinte esquema:

- ✓ Rifampicina: uma dose mensal de 600mg (duas cápsulas de 300mg) com administração supervisionada;



- ✓ Clofazimina: uma dose mensal de 300mg (três cápsulas de 100mg) com administração supervisionada e uma dose diária de 50mg auto-administrada; e
- ✓ Dapsona: uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária auto-administrada;
- Duração do tratamento: 12 doses mensais supervisionadas de rifampicina;
- Critério de alta: 12 doses supervisionadas em até 18 meses (Figura 1.3).

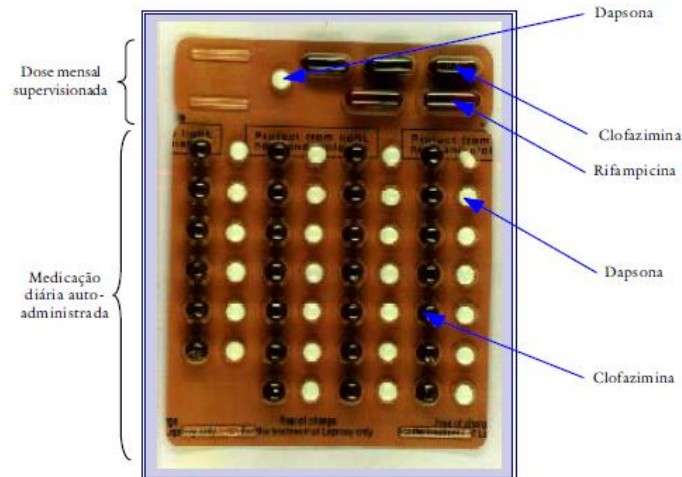


Figura 1.3: Cartela para esquema de tratamento para pacientes multibacilares

1.4.3- Esquemas de tratamento para crianças.

Para crianças com hanseníase, as doses de medicamentos dos esquemas paucibacilar e multibacilar, são ajustadas, de acordo com os seguintes quadros (Tabelas 1.1 e 1.2 e Figuras 1.4 e 1.5):

Tabela 1.1: Esquema de tratamento para crianças paucibacilares.

Idade	Dapsona (DDS) diária Auto-administrada	Dapsona (DDS) Supervisionada	Rifampicina (RFM) mensal Supervisionada
0 - 5	25mg	25mg	150-300mg
6 - 14	50-100mg	50-100mg	300-450mg

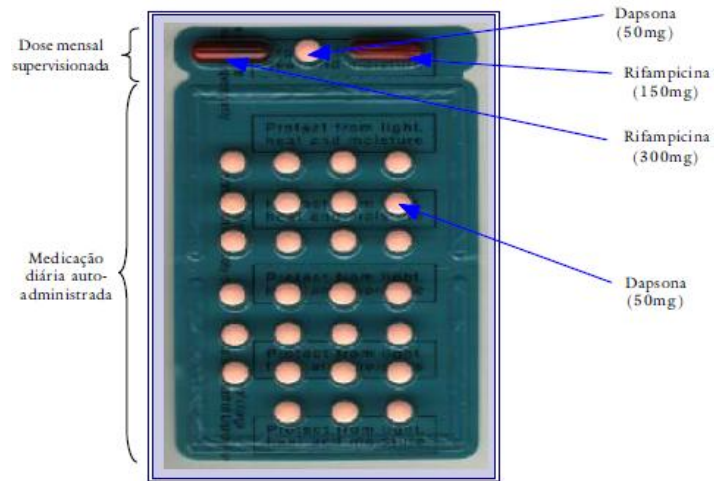


Figura 1.4: Cartela para esquema de tratamento para crianças paucilacilares

Tabela 1.2: Esquema de tratamento para crianças multibacilares.

Idade	Dapsona (DDS) Diária Auto-Administrada	Dapsona (DDS) Supervisionada	Rifampicina (RFM) Mensal Supervisionada	Clofazimina (CFZ)	
				Auto Administrada	Supervisionada Mensal
0 – 5	25mg	25mg	150-300mg	100mg/semana	100mg
6 - 14	50-100mg	50-100mg	300-450mg	150mg/semana	150-200mg

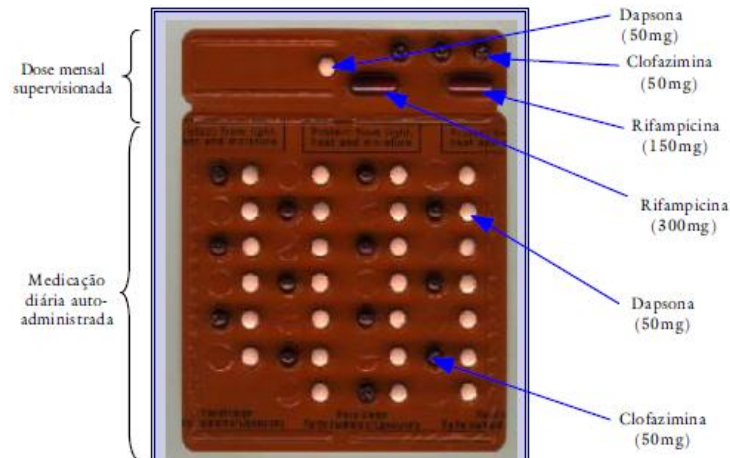


Figura 1.5: Cartela para esquema de tratamento para crianças multibacilares

1.4.4- Esquema alternativo

Os esquemas alternativos deverão ser utilizados nos casos de intolerância grave ou contraindicação a uma ou mais drogas do esquema-padrão PQT/OMS e serão disponibilizados apenas nos serviços de referência municipais, regionais, estaduais ou nacionais. A tabela 1.3 mostra o esquema alternativo para os casos de intolerância à dapsona (DDS).



Tabela 1.3: Esquema de tratamento alternativo.

Classificação Medicamento	Paucibacilares
Rifampicina (RFM)	Dose mensal de 600mg (2 cápsulas de 300mg), com administração supervisionada
Clofazimina (CFZ)	Dose mensal de 300mg (3 cápsulas de 100mg), com administração supervisionada
Clofazimina (CFZ)	Dose diária de 50mg autoadministrada
Classificação Medicamento	Multibacilares
Rifampicina (RFM)	Dose mensal de 600mg (2 cápsulas de 300mg), com administração supervisionada
Clofazimina (CFZ)	Dose mensal de 300mg (3 cápsulas de 100mg), com administração supervisionada
Ofloxacino (OFX)	Dose mensal de 400mg supervisionada e dose diária de 400mg autoadministrada + Clofazimina dose diária de 50mg autoadministrada <u>ou</u> Minociclina (MNC) dose mensal de 100mg supervisionada e dose diária de 100mg autoadministrada.

Considera-se uma pessoa de alta, por cura, aquela que completa o esquema de tratamento PQT, nos seguintes prazos:

Esquema paucibacilar (PB) – 6 doses mensais supervisionadas em até 9 meses. Na 6^a dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, às avaliações neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura.

Esquema multibacilar (MB) – 12 doses mensais supervisionadas (12 cartelas MB sem dapsona) + ofloxacino (ou minociclina) em até 18 meses. Na 12^a dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, às avaliações neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura.

Os pacientes MB que excepcionalmente não apresentarem melhora clínica e com presença de lesões ativas da doença, no final do tratamento preconizado de 12 doses (cartelas) deverão ser encaminhados para avaliação em serviço de referência (municipal, regional, estadual ou nacional) para verificar a conduta mais adequada para o caso.



1.5- A biotransformação e ação terapêutica de drogas

A variação interindividual na resposta do paciente ao tratamento medicamentoso é bem documentada, mas a capacidade de prever a segurança e eficácia de doses padrão da droga é baixa. Muitos fatores estão envolvidos: fatores genéticos, sexo, idade, interação medicamentosa, fisiologia individual, patofisiologia e fatores ambientais como consumo de álcool, fumo, hábitos alimentares.

Tem sido sugerido que a maioria dos medicamentos promove o efeito desejado em somente 50% dos pacientes quando administrado pelo esquema padronizado (Gurney, 2005). Os sujeitos restantes são ou sub-dosados, e não recebem nenhum benefício terapêutico, ou super-dosados, e sofrem de toxicidade à droga. Esta situação é particularmente perigosa no caso de drogas que possuem estreito índice terapêutico, tal como a maioria de agentes anticânceres, anticoagulantes e certos psicoativos (Crettol *et al.*, 2010).

Para produzir seus efeitos terapêuticos, a droga deve estar presente em concentrações apropriadas no seu sítio de ação sem toxicidade. Embora as concentrações terapêuticas sejam dependentes da dose administrada, elas também dependerão da magnitude e razão de absorção, distribuição, biotransformação e excreção.

A farmacocinética estuda o curso e distribuição da droga e seus metabólitos nos diferentes tecidos envolvendo os mecanismos de absorção, transporte, metabolismo e excreção. Por outro lado, a farmacodinâmica concentra-se nos efeitos bioquímicos e fisiológicos da droga e seus mecanismos de ação (Figura 1.6). As proteínas envolvidas nos efeitos da droga são definidas como moléculas alvo e incluem não somente receptores, mas também proteínas associadas com mecanismo de ação, como por exemplo, proteínas transdutoras de sinal (Hardman, 1996). Depois da sua administração, a droga é absorvida e então distribuída através do corpo requerendo a ação coordenada de várias proteínas, incluindo enzimas metabólicas, proteínas de transporte, proteínas receptoras, e outras. O medicamento pode entrar no corpo tanto como droga ativa ou como pró-droga inativa. A maioria das drogas é metabolizada no fígado para torná-las mais solúveis para subsequente eliminação através dos rins ou intestino. As pró-drogas requerem conversão metabólica, também chamada biotransformação, para liberar o composto ativo (Prows & Prows, 2004).

Os fatores que afetam a absorção da droga, biotransformação e eliminação, influenciam a quantidade da droga no corpo, sua disponibilidade para penetrar no sítio de ação e sua duração no corpo. As concentrações da droga no soro são usadas como indicadores de concentrações intracelulares no tecido alvo. Os fatores que influenciam as concentrações séricas da droga, por sua vez, controlam a incidência de efeitos adversos, bem como a eficácia



terapêutica. A depuração rápida do soro pode conduzir a concentrações sub-terapêuticas da droga nos tecidos, enquanto a taxa de depuração lenta pode levar ao acúmulo da droga e toxicidade.

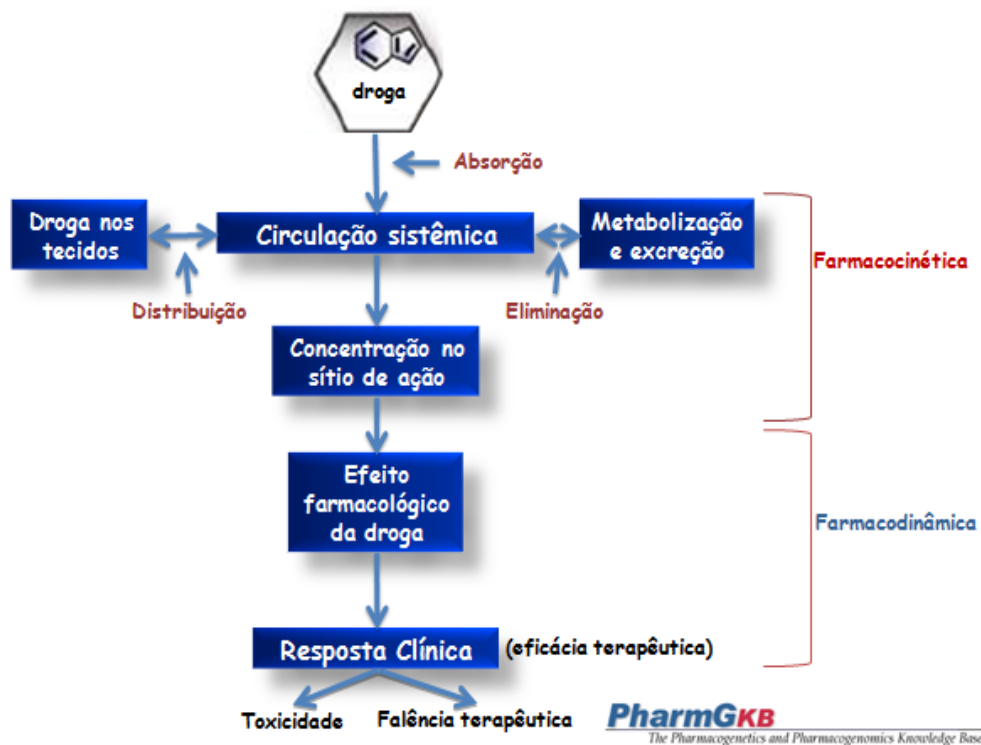


Figura 1.6: Efeito dos fármacos e a relação com as variáveis farmacocinética, farmacodinâmica e local onde ocorre a variabilidade biológica.

A biotransformação de drogas envolve a ação coordenada de grupos específicos de enzimas que vão converter quimicamente a droga, que é usualmente lipofílica para metabólitos mais polares, os quais são consideravelmente mais hidrofílicos e mais facilmente excretados. Os xenobióticos são usualmente lipofílicos e isto facilita seu transporte em associação com lipoproteínas no sangue e sua penetração em membranas lipídicas e entrada nos órgãos. No entanto, as propriedades físico-químicas das moléculas de drogas dificultam sua remoção do organismo por excreção biliar ou renal e, por conseguinte, estas substâncias requerem conversão enzimática para compostos solúveis em água (Hardman JG, 1996). A metabolização de xenobióticos, muitas vezes através de diferentes vias, pode gerar metabólitos que são mais tóxicos que os substratos e, através de sua interação com macromoléculas alvo tais como DNA, RNA, proteínas e receptores, geram o efeito tóxico. O órgão afetado é geralmente aquele responsável pela metabolização da droga ou excreção do metabólito (Hardman, 1996).



Os sistemas enzimáticos responsáveis pela biotransformação de muitas drogas estão localizados no retículo endoplasmático do fígado (fração microsomal). Tais enzimas estão presentes também nos rins, pulmões e epitélio gastrointestinal, embora em baixa concentração (Hardman, 1996). A modificação metabólica em biotransformação ocorre geralmente em duas etapas consecutivas e resulta na perda da atividade biológica. No metabolismo de fase I, um grupo funcional é introduzido na molécula original convertendo o xenobiótico em um metabólito com polaridade mais elevada por oxidação, redução ou hidrólise gerando uma molécula farmacologicamente inativa ou menos ativa, ou no caso de uma pró-droga, mais ativa. Este metabólito é então eliminado ou passa pelo metabolismo de fase II (também chamada síntese ou reação de conjugação), envolvendo ligação de um metabólito principal ou substrato endógeno tal como glucuronato, sulfato, acetato, aminoácidos ou glutatona. Tais reações enzimáticas incluem glucuronidação, metilação, sulfatação, acetilação, conjugação com glutatona e conjugação com glicina (Hardman *et al.*, 1996). Estes conjugados polares requerem a ação facilitada de proteínas transportadoras para possibilitar sua excreção das células. Diversas enzimas participam desse processo e podem ser divididas segundo o esquema abaixo (Figura 1.7)

A variabilidade genética tem sido descrita como tendo efeito sobre a absorção e metabolismo do fármaco e suas interações com receptores. Isto constitui a base para absorção lenta e rápida do fármaco, metabolismo do fármaco eficiente ou ultrarápido e interação pobre ou eficiente com o receptor farmacológico (Ingelman-Sundberg, 2001). As consequências de tais variações podem conduzir a reações adversas ao medicamento e/ou falha terapêutica.

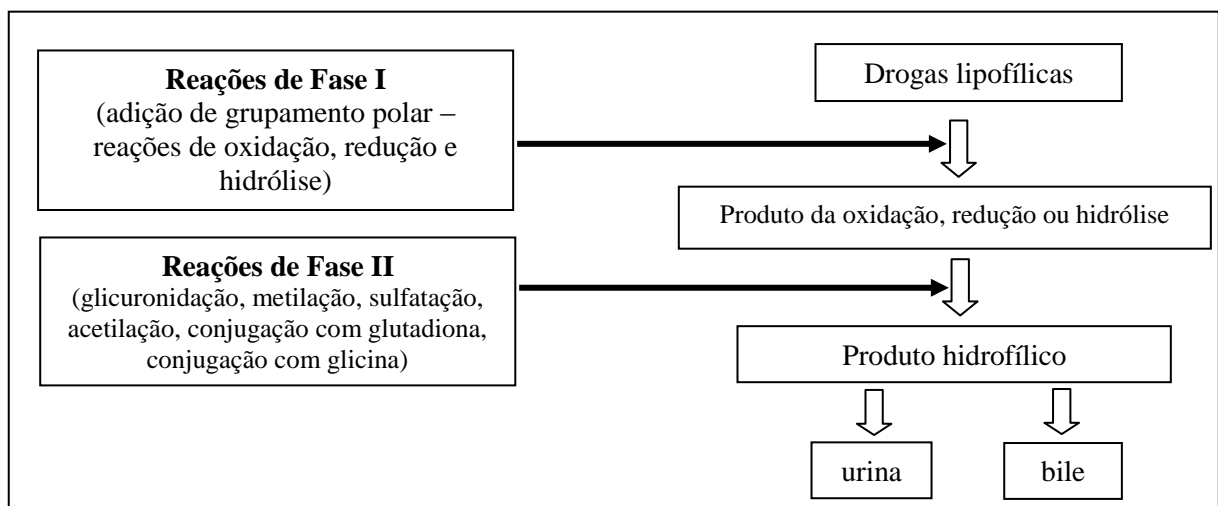


Figura 1.7: Reações de biotransformação de fármacos.



1.6- Dapsona e toxicidade

1.6.1 Histórico

A 4-4'-diaminodifenilsulfona (DDS-dapsona) foi sintetizada em 1908 por Fromm e Wittman (Fromm & Wittmann, 1908). A síntese não foi baseada em um problema terapêutico, mas representou um avanço no campo da química, que identificou uma molécula importante para a produção de corantes azo.

Sem conexão com o descobrimento de Fromm e Wittman, muitos esforços estavam sendo feitos naquela época para combater infecções bacterianas por meio de quimioterapia, por isso muitos compostos de sulfonamidas foram testados. Em 1933, o primeiro composto eficaz de sulfonamida foi submetido a ensaios clínicos e colocados em mercado como Prontosil[®] em 1935 (Dogmagk, 1935). Isto representou a grande realização de Gerhard Dogmagk, que descobriu que certas sulfonamidas desenvolvidas pelos químicos Drs. Klarer e Mietzch, com quem ele colaborou, mostraram potencial antibacteriano. Em seguida, iniciou-se uma extensa pesquisa para substâncias quimicamente semelhantes e por seus efeitos anti-infecciosos em várias doenças.

Embora a dapsona tenha sido sintetizada em 1908, muito antes da síntese das sulfonamidas, seu efeito antibacteriano foi investigado pela primeira vez em 1937. Dois grupos de pesquisa, Buttle e colaboradores (Buttle *et al.*, 1937), na Inglaterra, e Fourneau e colaboradores (Fourneau *et al.*, 1937), na França, foram os primeiros a retornar os experimentos com dapsona e investigaram seu efeito quimioterápico. Eles trataram experimentalmente infecções streptocócicas em ratos com dapsona e outras sulfonas e gonorréia em humanos com uma sulfona bissubstituída que tinha resultados comparáveis àqueles obtidos com sulfonamida. A alta dose usada (1000 a 2000mg/dia) causou anemia hemolítica em muitos pacientes no início, principalmente naqueles com deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD- Glucose-6-phosphate-dehydrogenase). Inicialmente, os derivados da dapsona, em vez do composto original, foram testados em humanos, por medo dos efeitos colaterais mais graves com dapsona.

No final de 1937, o derivado sulfona (Sodium Salt p,p'-diaminodiphenyl-sulfone-N'-didextrose sulfato) foi sintetizado e colocado no mercado sob o nome Promin[®] por Parke, Davis & Co. Esta droga foi investigada nos anos seguintes para tratar várias infecções por bacilos álcool ácido resistentes (BAAR). Em 1940, Promin[®] foi usado com sucesso por Cowdry (Cowdry, 1940) para tratar infecção por *Mycobacterium lapraemurium* em rato e por Feldman, Hinshaw e Moses (Feldman *et al.*, 1940) para tratar experimentalmente tuberculose induzida em porquinhos da Índia.

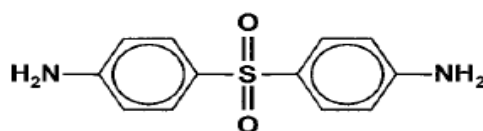


O primeiro ensaio clínico avaliando Promin no tratamento da hanseníase foi conduzido em março de 1941 e o resultado foi publicado em 1943. Faget e colaboradores. (Faget *et al.*, 1943) relataram que ele inibiu a evolução da lepra em um número considerável de casos. O composto sulfona-dapsona foi usado pela primeira vez de forma parenteral para tratar lepra em 1945 (Cochrane *et al.*, 1949). O primeiro uso oral da dapsona em hanseníase foi em 1949 por pesquisadores no Brasil, Nigéria e Guiana Francesa (Wozel, 1989). Pouco tempo depois, o uso de sulfonas foi introduzido na dermatologia. Além dos seus efeitos antimicrobianos, a dapsona é um potente agente antiinflamatório com alta efetividade em dermatites herpetiformes e uma ampla variedade de outras condições dermatológicas (Wozel & Barth, 1988; Zhu & Stiller, 2001).

Desde então, dapsona e sulfona têm sido usadas com sucesso para tratar uma ampla gama de doenças dermatológicas e sistêmicas como a hanseníase, leishmaniose, malária (pacientes resistentes a cloroquina) (Powell *et al.*, 1967), picadas de aranha marrom (Rees *et al.*, 1985), dermatites herpetiformes, acne vulgaris (Barranco, 1982), dermatose pustulosa subcórnea (Sneddon & Wilkinson, 1956) e certas doenças crônicas com um componente autoimune (Kumano *et al.*, 1983; Swain *et al.*, 1983; Grindulis & McConkey, 1984). Adicionalmente a DDS tem sido usada como um tratamento alternativo para Sarcoma de Kaposi (Poulsen *et al.*, 1984) e pneumonia por *Pneumocystis carinii* em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Leoung *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1989).

1.6.2- Estrutura química da dapsona

A dapsona é uma amina aromática chamada (4-4'-diaminodifenilsulfone, DDS) e é estruturalmente a mais simples das sulfonas, todas as quais partilham a estrutura característica: um átomo de enxofre ligado a dois átomos de carbono (Figura 1.8). Embora ela não seja solúvel em água, este pó branco inodoro é facilmente solúvel em álcool. A dapsona escurece quando exposta a luz, mas permanece quimicamente inalterada.



Dapsone

Figura 1.8: Estrutura da dapsona



1.6.3- Farmacocinética da dapsona

1.6.3.1- Absorção

Por causa da sua má solubilidade em água é difícil avaliar a disponibilidade da dapsona após administração intravenosa. A forma oral é bem absorvida a partir do trato gastrointestinal, embora lentamente, com biodisponibilidade de mais de 86% (Barranco, 1982). A absorção da dapsona é reduzida em casos de lepra grave (Venkatesan, 1989). As sulfonas bissubstituídas, tais como sulfoxona, são mal absorvidas depois da administração oral, e grande quantidade é excretada nas fezes (Peters *et al.*, 1975a). O tempo para atingir a concentração máxima no soro, após uma única dose oral de 100mg pode variar de 0,5 a 8 horas, com uma meia vida de absorção de 1,1 horas (Ahmad & Rogers H, 1980; Pieters & Zuidema, 1986). O intervalo terapêutico de concentração sérica é de 0,5 a 5mg/L para a hanseníase (Zuidema *et al.*, 1986). Geralmente, o tempo aceitável para concentração máxima no soro é de 2 a 6 horas. Sua meia vida de eliminação é altamente variável, entre 14 a 83 horas (Lammintausta *et al.*, 1979). Um estudo conduzido por Pieters & Zuidema, em 1986, encontrou diferenças significativas relacionada ao gênero no tempo de pico, bem como a concentração máxima da droga (Pieters F, Zuidema J, 1986). Concentrações máximas mais elevadas e picos de tempos inferiores foram observados em indivíduos do sexo feminino. De fato, 90% de uma simples dose de 100mg de dapsona será eliminada dentro de 9 dias, mas seguindo o tratamento a longo prazo, a droga pode ser encontrada no corpo até 35 dias depois de ser descontinuada (Lang, 1979). Esta situação, provavelmente, se deve a uma combinação de ligação da droga a proteínas e circulação hepática (Paniker & Levine, 2001).

1.6.3.2- Distribuição

Cerca de 70% da dapsona liga-se a proteínas, sendo assim, seu metabólito monoacetilado (MADDS) apresenta-se, quase que inteiramente, também ligado à proteína. A DDS é distribuída para todos os órgãos do corpo incluindo pele, fígado, rins e eritrócitos. A dapsona atravessa a barreira hematoencefálica e a placenta, sendo excretada no leite materno (Peters HJ, 1975a ; Edstein MD *et al.*, 1986; Venkatesan, 1989; Gatti *et al.*, 1997).

1.6.3.3- Metabolismo e excreção

Depois da absorção no trato gastrointestinal, a dapsona é transportada através da circulação portal para o fígado, onde é metabolizada via acetilação ou N-hidroxilação. A figura 1.9 mostra a conhecida via metabólica e suas inter-relações. A N-hidroxilação gera a hidroxilamina, um metabólito potencialmente tóxico produzido por enzimas do complexo



citocromo P-450, enquanto a acetilação pela N-acetiltransferase gera os metabólitos não tóxicos monoacetildapsona (MADDS) e diacetildapsona (DADDS) (Zuidema *et al.*, 1986).

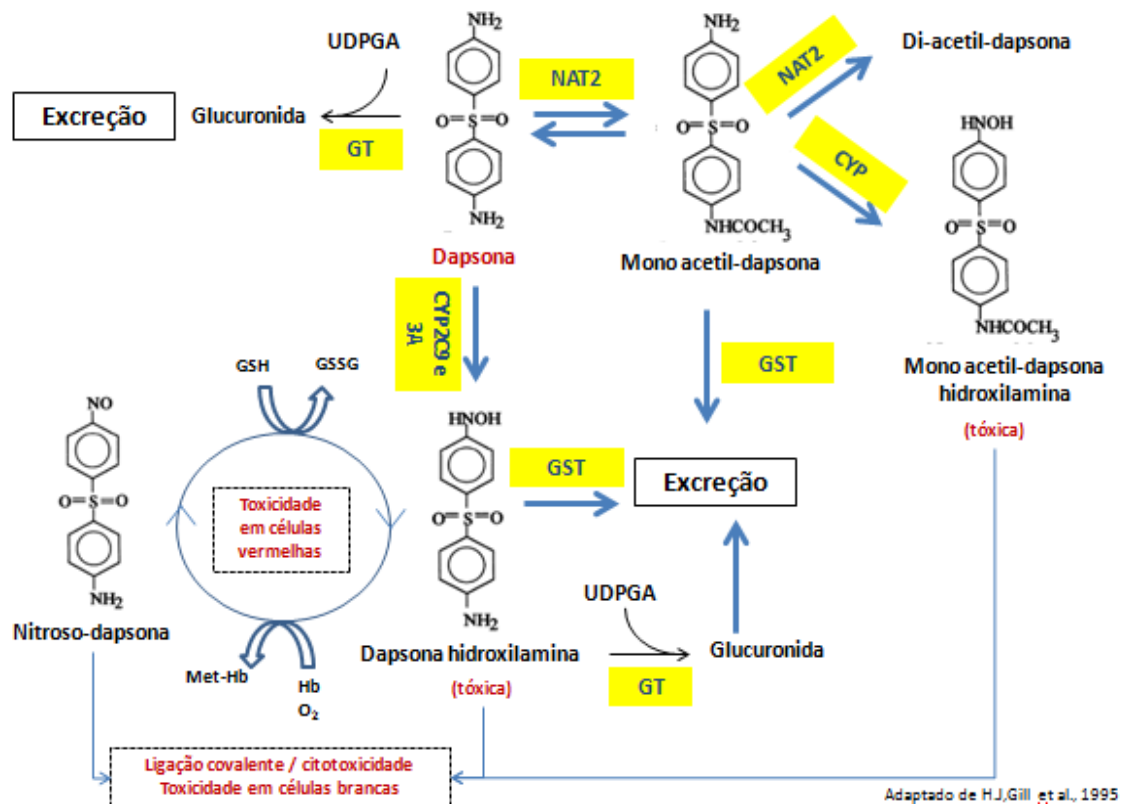


Figura 1.9: Vias metabólicas da dapsona em humanos (adaptado de Gill *et al.*, 1995). UDPGA - Uridina 5'-difosfo-ácido glucurônico; GT - Glucuronosiltransferase; NAT2 - N-acetiltransferase 2; CYP - Citocromo P-450; GSH - Glutathione (forma reduzida); GSSG - Glutathione oxidada (forma dimerizada da GSH); GST - Glutathione S-transferase.

1.6.3.3.1- Acetilação

A acetilação é uma das duas principais vias do metabolismo da dapsona. A enzima N-acetiltransferase, codificada pelo gene *NAT2* está presente no fígado e mucosa jejunal, é responsável por este processo metabólico (Glazco *et al.*, 1969; Karin *et al.*, 1981). Nesta reação, um grupamento amino da dapsona é acetilado para formar MADDS. A deacetilação de MADDS também ocorre resultando na formação de dapsona. O constante equilíbrio entre acetilação e desacetilação é atingido dentro de poucas horas depois da administração oral tanto de dapsona quanto de MADDS (Gelber *et al.*, 1971).

Durante a fase de absorção da MADDS, a razão de acetilação (monoacetildapsona: dapsona) parece ser elevada (Gelber *et al.*, 1971; Zuidema *et al.*, 1986). Isto pode ser considerado como uma indicação de que a desacetilação é um processo mais lento comparado a acetilação. A razão de acetilação mostra uma grande variação interindividual (0,1 a 2,0). Ela mostra uma distribuição bimodal determinada geneticamente e permite a definição de



acetiladores “lentos” e “rápidos” (Gelber *et al.* 1971; Peters *et al.* 1972, 1979; Hanson *et al.*, 1981; Philip *et al.* 1984). A frequência do gene *NAT2* controlando a acetilação lenta ou rápida varia grandemente em diferentes etnias e assim a distribuição da capacidade de acetilação varia geograficamente (Karim *et al.* 1981).

Vários estudos têm sido realizados para a elucidação do efeito da razão de acetilação na eficácia e toxicidade da dapsona; de acordo com os resultados, os mesmos sugerem que a razão da acetilação não afeta a meia vida (Peters *et al.*, 1975c) ou a eficácia da droga (Crook *et al.*, 1983). Embora alguns pesquisadores não tenham encontrado uma correlação entre o perfil de acetilação e efeitos adversos (Crook *et al.* 1983; Queiroz *et al.*, 1997), outros sugerem um efeito do perfil de acetilação na toxicidade da droga (Guo *et al.*, 1996; Bluhm *et al.*, 1999). Bluhm e colaboradores, em um estudo funcional, mediram a razão de acetilação e N-hidroxilação em pacientes tratados com dapsona para dermatoses inflamatórias e verificou que, de quatro pacientes que haviam tido efeitos adversos, todos eram acetiladores lentos, sendo que dentre estes, 3 eram hidroxiladores rápidos. Em pacientes com SIDA, acetiladores lentos têm uma maior incidência de efeitos adversos que acetiladores rápidos (Guo *et al.*, 1996).

Polimorfismos genéticos no gene *NAT2*, responsável pelo fenótipo de acetilação, podem influenciar a metabolização de um grande número de outras drogas, incluindo isoniazida, sulfonamidas, hidralazina (Drayer & Reidenberg, 1977; Souich & Lambert, 1981; Paxton, 1984; Teixeira *et al.*, 2010; Spinassé *et al.*, 2013) e em alguns casos, o perfil de acetilação lento encontra-se associado a ocorrência de efeitos adversos. Contudo, até o momento nenhuma associação foi demonstrada para a dapsona como o foi para isoniazida e hidralazina (Teixeira *et al.*, 2011; Spinassé *et al.*, 2013).

1.6.3.3.2 Hidroxilação

A hidroxilação é a segunda principal via do metabolismo da dapsona e pode ter responsabilidade nos efeitos adversos hematológicos da droga (Hjelm & de Verdier, 1965; Cucinell *et al.*, 1972; Kramer *et al.*, 1972; Scott & Rasbridge, 1973). No entanto, a instabilidade química e a alta reatividade dificultam a mensuração do produto da hidroxilação nos fluidos biológicos e as concentrações no soro são muito baixas mesmo para os modernos métodos de detecção ((Beckett *et al.*, 1979).

A N-hidroxilação é efetuada no fígado pelo sistema oxidase de função mista do retículo endoplasmático na presença de oxigênio e NADPH, mas também pode ocorrer na fração microsomal dos tecidos entero-hepáticos (Uehleke, 1971).



A N-hidroxilação da dapsona e de seu derivado acetilado foi atribuída à família 3A de isoenzimas do citocromo P-450 (3A4 e 3A5) e tem sido proposta como um marcador para este grupo de enzimas (Watkins PB, 1994). Contudo, estudos utilizando microsossomos de fígado humano indicam que outras enzimas também são capazes de metabolizar a droga e estão envolvidos na formação de dapsona hidroxilamina (Vage & Svensson 1994; Gill *et al.* 1995), especialmente CYP2E1, mas também CYP2C9 (Mitra *et al.*, 1995).

A dapsona mostra dois tipos de toxicidade, ambos possivelmente mediados por N-oxidação (Utrecht *et al.*, 1988; Coleman *et al.*, 1989). Uma delas é a toxicidade dirigida por eritrócitos, que é observada em todos os indivíduos e geralmente bem tolerada, porém, com uma variabilidade interindividual. Entretanto, essa toxicidade pode se tornar um problema clínico quando a droga está em altas doses (>100mg/dia) (Manfred *et al.*, 1979), especialmente em pacientes deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Grossman & Jollow, 1988) ou em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Benichou *et al.*, 1994). Outro tipo de toxicidade mais grave é uma reação idiossincrática que envolve as células brancas, e resulta em agranulocitose, febre e erupções, ocorrendo em uma pequena proporção da população (Friman *et al.*, 1983; Martin *et al.* 1992). A síndrome de Stevens-Johnson tem também sido relatada em pacientes sob terapia com dapsona (Pertel & Hirschtick, 1994). A hemotoxicidade da dapsona é mediada pelo metabólito hidroxilamina, que é capaz de ser co-oxidado com hemoglobina (Hb) nas células vermelhas do sangue para produzir dapsona nitroso (Figura 1.7) e meta-hemoglobina (Met-Hb) (Coleman *et al.*, 1989; Utrecht *et al.*, 1988), podendo o composto nitroso ser reduzido de volta a hidroxilamina pela ação da glutathione. Assim, existe um ciclo de oxido-redução no qual as células usam oxigênio para eliminar glutathione e NADPH (Kramer *et al.*, 1972).

Embora a sulfatação ocorra, as hidroxilaminas sofrem principalmente glucoronidação e o metabólito principal, aproximadamente 30% da dose, é dapsona hidroxilamina N-glucoronido (Israili *et al.* 1973; Coleman & Tingle, 1992). Algumas das hidroxilaminas entram na corrente sanguínea e penetram rapidamente nos eritrócitos, de modo que não podem ser detectadas diretamente no plasma humano (Zuidema *et al.* 1986). A hidroxilamina causa a meta-hemoglobinemia que ocorre de 30-60 min após a administração da droga. É sabido que uma proporção substancial de hidroxilamina escapa da glucoronidação de fase II.

A toxicidade induzida pela dapsona nas células brancas é mal compreendida, mas também se acredita ser uma consequência da formação de hidroxilamina, possivelmente envolvendo a oxidação de outros intermediários dentro da célula alvo (Utrecht *et al.* 1988).



A variação interindividual dos níveis de expressão das enzimas citocromos P-450 e o envolvimento de mais de uma isoforma de CYP na hidroxilação da dapsona pode ser um fator determinante na suscetibilidade aos efeitos tóxicos da dapsona (Israili, 2001).

Uma abordagem alternativa para bloquear completamente a toxicidade induzida pela hidroxilamina seria a modificação química da droga. No entanto, estudos envolvendo a estrutura/atividade da mesma mostraram que a extensa N-hidroxilação da dapsona, observadas tanto *in vitro* como *in vivo*, é uma função das propriedades químicas do grupo *p*-sulfona (Mahmud *et al.*, 1997), a qual é essencial para a atividade farmacológica (Mahmud *et al.*, 1997).

1.6.4- Efeitos Adversos

A oxidação do grupo funcional amina aromática é o principal mecanismo que conduz às várias toxicidades associadas com a dapsona (Tabela 1.4) (Paniker & Levine, 2001). Os efeitos colaterais mais frequentes da dapsona são de natureza hematológica. Esses efeitos ocorrem em quase todas as pessoas tomando dapsona, mas eles são usualmente tão brandos que não são notificados. O metabolismo da dapsona pelas enzimas do complexo Citocromo P-450, com a conseqüente geração de hidroxilaminas, é responsável por alguns desses efeitos colaterais incluindo a meta-hemoglobinemia, a hemólise, a agranulocitose fatal e a síndrome da dapsona. Entretanto, o mecanismo pelo qual a hidroxilamina causa esses efeitos ainda não está claro.



Tabela 1.4: Tipos de efeitos adversos induzidos pela dapsona (Paniker & Levine, 2001).

Síndrome de		
Hematológicos	Hipersensibilidade a Dapsona	Hepático
Hemólise	Febre, mal-estar	Hepatite tóxica
Meta-hemoglobinemia	Linfoadenopatia	Icterícia colestática
Leucopenia	Erupção morbiliforme	
Agranulocitose	Hepatomegalia com icterícia	
Sistema Nervoso		Diversos
Neuropatia periférica	Náusea e vômito	
Psicose	Dor de cabeça	
	Fraqueza	
	Cansaço	
	Tonturas	
	Falta de ar	

1.6.4.1- Efeitos Hematológicos

1.6.4.1.1- Hemólise

Quase todos os pacientes tratados com dapsona apresentam algum grau de hemólise e metemoglobinemia (Zone, 2001). A hemólise com formação de “corpúsculos de Heinz” é o segundo efeito colateral mais importante da dapsona (DeGowin, 1967; Graham, 1975).

O metabólito hidroxilamina da droga é responsável por essas anomalias hematológicas. A hidroxilamina e o derivado nitroso oxidado podem oxidar glutatona, que é essencial na manutenção da integridade das células vermelhas do sangue. Quando a integridade da membrana é comprometida pela oxidação da glutatona, a hemólise ocorre (Paniker & Levine, 2001).

De particular importância neste sistema são NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e G6PD (Glicose 6 fosfato desidrogenase). A glutatona redutase, a qual mantém a glutatona na sua forma reduzida padrão, requer NADPH como um cofator. NADPH também é produzida pela ação de G6PD em NADPH.

Pacientes deficientes de G6PD são menos suscetíveis a meta-hemoglobinemia e mais suscetíveis a hemólise. A deficiência de G6PD leva ao comprometimento do derivado hexose monofosfato e, portanto, a uma diminuição na formação de NADPH. Conseqüentemente, a



regeneração do metabólito hidroxilamina da dapsona e seus efeitos na formação de meta-hemoglobina são reduzidos.

O aumento da idade e dosagem diária também tem sido associados com o aumento da magnitude de hemólise relacionada à dapsona. Para minimizar a hemólise, a dosagem diária da dapsona não deve exceder a 1,5mg/Kg de peso corporal ou 100mg em indivíduos normais e 50mg em indivíduos deficientes de G6PD (Balakrishnan *et al.*, 1989).

1.6.4.1.2- Meta-hemoglobinemia

A meta-hemoglobinemia é o efeito colateral mais comum da dapsona. Ela é normalmente bem tolerada em baixa a moderada dose, mas pode se tornar um sério problema em dosagens acima de 200mg/dia de dapsona (Coleman, 1993). O metabólito hidroxilamina reage com a hemoglobina, na presença de oxigênio, levando a formação de metemoglobina. Quando NADPH está disponível, o metabólito hidroxilamina pode ser regenerado, conduzindo a formação de mais meta-hemoglobina (Zuidema *et al.*, 1986). Sob condições normais, a meta-hemoglobina é reduzida por NADPH dependente de meta-hemoglobina redutase. Poucos pacientes com deficiência de meta-hemoglobina redutase desenvolvem meta-hemoglobinemia marcante com baixa dose terapêutica de dapsona (Beiguelman *et al.*, 1974). A maioria dos casos significativos tem ocorrido a partir de superdosagens (Ward & McCarthy, 1998), onde os pacientes tornam-se sintomáticos com níveis de meta-hemoglobina acima de 35%, uma vez que a mesma não transporta oxigênio de forma eficiente. Em doses padrão (100mg/dia), estes níveis estão abaixo de 15%.

1.6.4.1.3- Agranulocitose

A agranulocitose, na maioria das vezes, é uma condição exclusivamente mediada por drogas e é pouco entendida (Utrecht, 1992). Estudos indicam que a agranulocitose ocorre em dois ou três meses após ter sido iniciado o tratamento com dapsona e que a perda de células é gradual tão logo o início da terapia (Duhra & Charles-Holmes, 1991). A possível causa desse efeito adverso é a toxicidade de metabólitos de hidroxilaminas, derivados da dapsona, aos mononucleócitos e medula óssea *in vitro* (Coleman & Tingle, 1992).

Coleman MD, em 1995, verificou que eritrócitos expostos a hidroxilamina e lavados repetidamente podem ainda liberar este metabólito em concentrações suficientes para matar leucócitos mononucleares *in vitro*. Assim, os eritrócitos poderiam ser a via pela qual a hidroxilamina atinja a medula óssea, se ligando covalentemente a precursores de granulócitos,



e assim dirigindo uma resposta imune em certas pessoas e conduzindo a uma agranulocitose fatal (Coleman, 1995).

1.6.4.2- Hepatotoxicidade

A colestase tem sido relatada em pacientes recebendo dapsona. Esta condição é considerada prontamente reversível com a interrupção da droga. A icterícia colestatia que pode ocorrer não está relacionada à dose ou duração da terapia (Stone & Goodwin, 1978). A hepatite tóxica ocasionalmente vista em tratamento com dapsona está associada, na maioria das vezes, com a síndrome da hipersensibilidade a droga (Paniker & Levine, 2001)

1.6.4.3- Síndrome da hipersensibilidade a dapsona.

Nesta condição, a dapsona deve induzir uma síndrome de hipersensibilidade semelhante às de infecções mononucleoses. Ela é geralmente descrita como uma combinação de pelo menos dois dos seguintes sintomas: i) febre, ii) linfadenopatia, iii) erupções generalizadas e iv) hepatite, ocorrendo ainda anormalias hematológicas com eosinofilia e linfócitos atípicos podendo envolver outros órgãos (Roujeau & Stern, 1994; Bocquet *et al.*, 1996; Criado *et al.*, 2002). Este envolvimento multivisceral é o que diferencia de outras reações cutâneas à drogas comuns (Bocquet *et al.*, 1996). A síndrome completa consiste de todos os quatro sintomas (Jamrozik, 1986) e ocorre numa razão de 2-12% (Smith, 1988). Baseada em observações individuais, proporção de óbitos associados a esta ADR é de aproximadamente 13-15% (Smith, 1988; Wozel & Goebel, 2001; Leta, 2003). Em recente meta-análise conduzida por Lorez M e colaboradores em 2012, abrangendo todas as publicações a respeito de casos de HR (reações de hipersensibilidade), para evidenciar a frequência bem como as apresentações clínicas, fatores de risco e razão de fatalidade, constatou-se que a prevalência de HR à dapsona, entre os estudos com informações consistentes foi de 1,4%. Entre todos os casos, a razão de fatalidade foi de 9,9%. O envolvimento de mucosa, erupções, hepatite, idade avançada, hanseníase como indicação para uso de dapsona e ocorrência da doença em países em desenvolvimento foram associados com mais alto fator de risco para desfecho fatal (Lorez *et al.*, 2012).

1.6.4.4- Efeitos Neurológicos

A neuropatia sensorial e motora periférica associada com dapsona parece ser devido à lesão axonal dirigida pela droga (Ahrens *et al.*, 1986). Embora a duração da terapia pareça não relacionada com esta toxicidade em particular, pacientes recebendo doses mais elevadas



(200 a 400mg/dia) estariam mais propensos a serem afetados (Gutmann *et al.*, 1976). Os sintomas incluem parestesias, fraqueza e atrofia da extremidade dos músculos, que são usualmente reversíveis, mas podem ser permanentes se expostos a droga por um longo período (Ahrens *et al.*, 1986). Incidentes isolados de psicose associada à dapsona tem sido relatados (Fine *et al.*, 1983).

Estas reações adversas não só afetam a taxa de morbidade e mortalidade, mas também podem levar a interrupções de tratamento, insuficiência e recaída contribuindo para a propagação da doença e o surgimento de bactérias resistentes.

Reações adversas a drogas (ADRs) são causas comuns de hospitalização e causam um grande custo para a sociedade. Há dois principais encargos financeiros devido a doenças causadas por ADRs: aquele do tratamento e aquele de evitá-los (Lundkvist & Jonsson, 2004). A ocorrência de ADRs sérias e fatais tem sido estudada extensivamente em pacientes hospitalizados e um estudo de meta-análise prospectivo em aproximadamente quarenta hospitais nos Estados Unidos da América (EUA) sugere que 6-7% dos pacientes hospitalizados sofrem de sérias ADRs e 0,32% dos pacientes desenvolve ADRs fatais (Hug *et al.*, 2003). Isto resulta em cerca de 100.000 mortes por ano nos Estados Unidos e um custo anual de mais de cem bilhões de dólares para a sociedade devido à hospitalização prolongada e produtividade reduzida (Ingelman-Sundberg, 2001; Hug *et al.*, 2003). Além disso, tem sido estimado que as ADRs sejam responsáveis por cerca de 7% de todas as internações em hospitais no Reino Unido e 13% em clínicas médicas na Suécia (Ingelman-Sundberg, 2001). Adicionalmente, na França, um estudo de 10 anos na Unidade do Fígado do Hospital Beaujon em Paris mostrou que entre todos os pacientes hospitalizados com hepatite aguda, 10% eram devido a ADRs e a prevalência de hepatotoxicidade em pacientes com mais de cinquenta anos excedia 40%. No Japão e outros países orientais, as drogas são responsáveis por cerca de 10-20% dos casos de hepatite fulminante (Larrey, 2002).

1.7- A genética na farmacologia

Há evidências acumuladas que combinações de genes específicos influenciam significativamente a eficácia da droga. É estimado que em humanos exista 20.000-25.000 genes (IHGSC, 2001), que fisicamente representam a região cromossomal que codifica todo o complemento de proteínas da célula, incluindo as enzimas de biotransformação. As variações alélicas presentes em regiões codificantes dos genes podem alterar a sequência das proteínas codificadas; em sequências de DNA dentro de regiões regulatórias do gene podem alterar sua taxa de transcrição e a síntese de proteínas.



Um par de alelos constitui um lócus do gene em uma localização cromossomal particular. Eucariotos podem carregar um par de alelos idênticos (homozigoto) ou duas diferentes formas alélicas do gene (heterozigoto). O termo genótipo refere-se ao alelo particular de um gene específico que está presente em cada célula do organismo, enquanto o fenótipo é o efeito observado do genótipo em combinação com fatores ambientais.

A diversidade genética é um importante fator na evolução e é um processo natural que pode afetar o fenótipo nos organismos. A alteração de bases no DNA pode ser induzida por fatores ambientais (tais como UV ou radiação ionizante e certos agentes químicos) ou deve ocorrer espontaneamente a partir de erros na replicação do DNA. Mutações na sequência de DNA ocorrem randomicamente e seus efeitos no fenótipo não são facilmente previstos. Mutações são chamadas polimorfismos se elas são transferidas para geração subsequente (células germinativas) e ocorrem com uma frequência acima de 1%. Há três principais tipos de variações: SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)- polimorfismo de base única; VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) e Indels (inserções/deleções de bases) de um ou mais nucleotídeos (Crettol *et al.*, 2010).

Os SNPs são os mais comumente estudados na farmacogenética. O objetivo de tais estudos tem sido correlacionar variações nas sequências de genes com a resposta do paciente à terapia. Os SNPs se dividem em duas grandes categorias: causais e não-causais. Os SNPs causais são diretamente responsáveis por alterações na quantidade e/ou atividade de proteínas, incluindo enzimas metabolizadoras de drogas. Ao contrário, SNPs não-causais não são diretamente responsáveis por tais trocas, mas devido a sua proximidade ao SNP causal, esses SNPs são também passados para gerações subsequentes. Os SNPs não-causais servem como marcadores genéticos que indicam a existência dos SNPs causais no gene de interesse. Marcadores genéticos podem ser úteis nos estudos de farmacogenética mesmo que os SNPs causais possam não ter sido identificados (Neale & Sham, 2004).

Os SNPs costumam aparecer, em média, a uma taxa de um a cada 300-1000 pares de base (pb) no genoma. O genoma humano inteiro contém 3 bilhões de pares de bases e o total do número de SNPs é cerca de 5-10 milhões por genoma haplóide. Muitas pesquisas na farmacogenética têm considerado SNPs em relação à resposta a droga, mas aumenta o reconhecimento que tais abordagens são às vezes inadequadas. Em vez disso, os haplótipos podem ser necessários na análise de variação farmacogenética. (International HapMap Consortium, 2005). A análise de haplótipos é agora o método preferido de pesquisa para estudos de associação entre variações genéticas e eficácia da droga.



1.7.1- Farmacogenética: Considerações na sua aplicação à terapia medicamentosa

A farmacogenética é o estudo das variações genéticas associadas a diferenças individuais na resposta a droga, incluindo alterações na eficácia, interações droga a droga e o risco relativo de uma resposta adversa à droga. Ela inclui o estudo de polimorfismos genéticos que poderiam afetar a expressão ou atividade de transportadores de drogas, enzimas metabolizadoras de drogas e receptores de drogas (Ingelman-Sundberg, 2001; Roses, 2002; Prows & Prows, 2004). O objetivo da farmacogenética é identificar pacientes ou grupos de pacientes em populações onde poderiam ser feitos ajustes de tratamento para melhorar a segurança e a eficácia dos medicamentos.

O estudo de polimorfismos genéticos em genes codificantes para enzimas metabolizadoras de drogas é de grande importância no entendimento da variabilidade na resposta do paciente ao tratamento medicamentoso, embora nem toda variabilidade tenha uma base genética. Fatores adicionais tal como idade, uso concomitante de outra droga, existência de condições relacionada à saúde (por exemplo, alergias, fumo), peso, hábitos alimentares e outras comorbidades também influenciam a eficácia da droga. Assim, a capacidade metabólica da droga em indivíduos depende do fenótipo bem como do genótipo. Isto introduz outro fator que tem que ser levado em conta na análise farmacogenômica.

Há um número de fatores motivantes para expandir o conhecimento sobre farmacogenética. A ampla comunidade de pacientes tem interesse na melhoria da eficácia do medicamento e minimização dos efeitos adversos. As indústrias farmacêuticas envolvidas no desenvolvimento de novos fármacos poderão ver o valor da farmacogenética, bem como potenciais armadilhas. Projetar drogas com uma maior consciência de seus potenciais efeitos adversos pode diminuir a incidência de problemas subsequentes após a sua liberação e minimizar a possibilidade de falhas no investimento. Isto é significativo porque o custo aproximado de introduzir uma nova droga no mercado é na ordem de US\$ 150-800 milhões. A estratificação de pacientes de modo que eles sejam mais adequados às novas drogas podem melhorar os resultados terapêuticos, embora o número de pacientes que possam ser tratados pode ser menor.



1.7.2- Farmacogenética e biotransformação da dapsona

Em humanos, a dapsona é metabolizada por um número de rotas alternativas (Figura 1.9) e tem uma complexa disposição farmacocinética. Uma proporção da droga é acetilada pela enzima N-acetiltransferase para monoacetildapsona (Gelber *et al.*, 1971; Zuidema *et al.*, 1986). Acredita-se que a via de acetilação é dominante, pois a proporção de monoacetildapsona para dapsona no plasma se correlaciona com outras medidas de acetilação com drogas que sofrem somente acetilação (Gelber *et al.*, 1971). De forma semelhante com outros medicamentos que são acetilados, a acetilação da dapsona apresenta uma distribuição polimórfica, com variação étnica na frequência de acetiladores lentos e rápidos (Gelber *et al.*, 1971; Weber & Hein, 1985; Evans, 1989).

A principal via de eliminação metabólica identificada é N-hidroxilação. Em microsomas de fígado humano, esta rota de metabolismo tem sido mostrada ser mediada por várias enzimas Citocromo P-450 (CYP), incluindo CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C9 (Fleming *et al.*, 1992; Mitra *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1995). Os produtos desta rota metabólica têm sido descritos como nexos causais de toxicidades hematológicas (Grossman & Jollow, 1988; Utrecht *et al.*, 1988; Coleman *et al.*, 1989; Riley *et al.*, 1990; Tingle *et al.*, 1990; Vage *et al.*, 1994). Isto contrasta com monoacetildapsona, que não é tóxica para as células vermelhas do sangue.

Tanto NAT2 quanto CYP-450 são extremamente polimórficos e a avaliação de polimorfismos funcionais nesses genes pode contribuir para um melhor entendimento do potencial da variabilidade genética na resposta a dapsona no tratamento da hanseníase e doenças inflamatórias.

1.8- N-acetiltransferase

As arilaminas N-acetiltransferases, NAT1 e NAT2, são enzimas citosólicas responsáveis pela conjugação de uma variedade de compostos nitrogenados, incluindo aminas aromáticas e amidas, hidrazinas e hidrazidas. A acetilação de substrato via isoenzimas NAT tem um papel importante na biotransformação, depuração e toxicidade para vários agentes farmacológicos e tóxicos ambientais (Hein *et al.*, 2000; Sim *et al.*, 2007). Embora a função de N-acetilação tenha sido a primeira a ser caracterizada, a O-acetilação e atividades N,O-acetiltransferase são também bem caracterizadas (Grant *et al.*, 1997). Estas atividades de NAT fazem essas enzimas participar tanto da detoxificação (tipicamente N-acetilação) quanto ativação (O-acetilação) das aminas aromáticas.



O “trato acetilador”, caracterizado pelas diferenças na capacidade de N-acetilar certas drogas, foi uma das primeiras características metabólicas hereditárias identificadas afetando a resposta à droga (Hughes *et al.*, 1954). Quando a isoniazida foi introduzida como um agente anti-tuberculose há 50 anos, os pesquisadores verificaram que a droga era altamente eficaz, mas uma significativa proporção dos pacientes (3,5-17%) apresentava efeitos colaterais graves em forma de danos progressivos ao sistema nervoso. Estudos subsequentes revelaram diferenças interindividuais na capacidade de acetilar a droga, onde pacientes que eram menos capazes de acetilar a isoniazida, como evidenciado pelos níveis mais baixos de acetil-isoniazida excretada, foram mais susceptíveis em apresentar os efeitos adversos observados (Weber & Hein, 1979; Shimizu *et al.*, 2006).

Variações na acetilação foram primeiramente identificadas na depuração de medicamentos, mas sua função na ativação e detoxificação de arilaminas ambientais têm recebido também considerável atenção. Uma crescente literatura vem explorando o impacto de diferenças genéticas na função NAT e risco de câncer em diversos tecidos: bexiga, colorretal, mama, cabeça e pescoço, pulmão e carcinomas de células escamosas orais. Estes estudos foram conduzidos em populações expostas a arilaminas na fumaça de cigarros e na dieta (Dalhoff *et al.*, 2005; Roemer *et al.*, 2008; Weistenhofer *et al.*, 2008).

Grant e colaboradores (1997) verificaram que a transformação final de uma amina aromática em metabólitos, reativos ou não ao DNA, depende de uma complexa rede de fatores incluindo a eficiência catalítica das enzimas envolvidas na acetilação (ambas NAT1 e NAT2) bem como outras enzimas (Grant *et al.*, 1997). Esta rede de enzimas envolve as ações da Uridina difosfato (UDP)-glucuronosiltransferases, enzimas citocromo P-450, a função peroxidase da prostaglandina H sintetase (PHS) e desacetilases microssomais. Similar a NAT, muitas destas enzimas são moduladas por polimorfismos genéticos e/ou influências ambientais levando a uma interação complexa entre NAT e numerosas outras enzimas e fatores de risco na modulação de arilaminas (Hein *et al.*, 2000; Vaziri *et al.*, 2001).

Uma vasta gama de polimorfismos em NAT já foi descrita, com foco em seu efeito sobre a atividade de acetilação (influência do genótipo no fenótipo), frequências populacionais em diferentes grupos étnicos e evidência epidemiológica molecular envolvendo polimorfismos NAT e o risco de exposição ambiental a arilaminas (Iyer & Rataim 1998; Daly, 2003; Minchin *et al.*, 2007).

A NAT catalisa um mecanismo cinético em duas etapas requerendo o cofator acetil coenzima A (acetil CoA). O grupo acetil do acetil CoA é primeiro transferido para o resíduo cisteína no sítio ativo de NAT, resultando na liberação da CoA. O grupo acetil é



posteriormente transferido da enzima acetilada para o grupo amina do substrato com regeneração da enzima livre (Hein, 1988; Hein *et al.*, 2000). Um grande número de drogas terapêuticas contendo aminas são depuradas através de N-acetilação catalisada por NAT. Estas incluem, além da isoniazida, a droga procainamida antiarrítmica (PA), o agente quimioterapêutico aminoglutatimida, várias sulfonamidas (por exemplo sulfametoxazole), o anti-inflamatório ácido 5-aminosalicílico (5-AS), o anti-hipertensivo hidralazina, o inibidor da monoamina-oxidase fenelzina e dapsona. Os metabólitos secundários arilaminas ou aril-hidrazina de muitos fármacos, tal como sulfasalazina, acebutolol e cafeína, estão também sujeitos a N-acetilação por NAT.

1.8.1- Genética molecular de NAT2

Os estudos acerca da genética molecular das N-acetiltransferases em humanos identificaram a presença de três *loci*: dois que codificam para duas enzimas similares (NAT1 e NAT2) e um terceiro que constitui um pseudogene conhecido como *pNAT*, como mostra a figura 1.10. Os três *loci* estão localizados no cromossomo 8 entre 170-360Kb da região 8q22. Essa região é instável e frequentemente deletada em células tumorais (Sim *et al.*, 2000). O *pNAT* é um pseudogene que tem um códon de parada prematuro, e não é transcrito. Os genes *NAT1* e *NAT2* possuem 873 pb, não apresentam introns, codificam proteínas de 34KDa que possuem identidade de 81% enquanto seus respectivos genes apresentam 87% de similaridade.

NAT1 e *NAT2* são polimórficos e SNPs em suas regiões codificantes podem alterar a atividade enzimática e velocidade da acetilação (Fretland *et al.*, 2001; Zang *et al.*, 2007) e são a base dos três principais fenótipos geneticamente determinados, que podem classificar os indivíduos em acetiladores rápidos, intermediários e lentos, respeitando uma herança de co-dominância (Parkin *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2006). Outros estudos vêm sugerindo que o perfil de acetilação lento é devido a uma herança autossômica recessiva (Nerbert *et al.*, 2002; Ait Moussa *et al.*, 2002).

O formato básico da nomenclatura é identificar a isoenzima, NAT1 ou NAT2, seguido por **n* (por exemplo, *5) indicando a ordem do aparecimento do alelo na literatura, independentemente do fato do alelo ter sido encontrado em animais ou seres humanos. Além disso, um alelo particular pode ter a designação do subtipo A ou B.

Até o presente momento, mais de 80 alelos para o gene *NAT2* já foram identificados e classificados na população humana em função da combinação de até quatro SNPs presentes em toda a região codificante. As listas mais recentes de variantes alélicas aparecem no site



oficial de nomenclatura de NATs (nat.mbg.duth.gr), com 42 SNPs descritas na região codificante de *NAT2*, incluindo SNPs raros (Teixeira *et al.*, 2010).

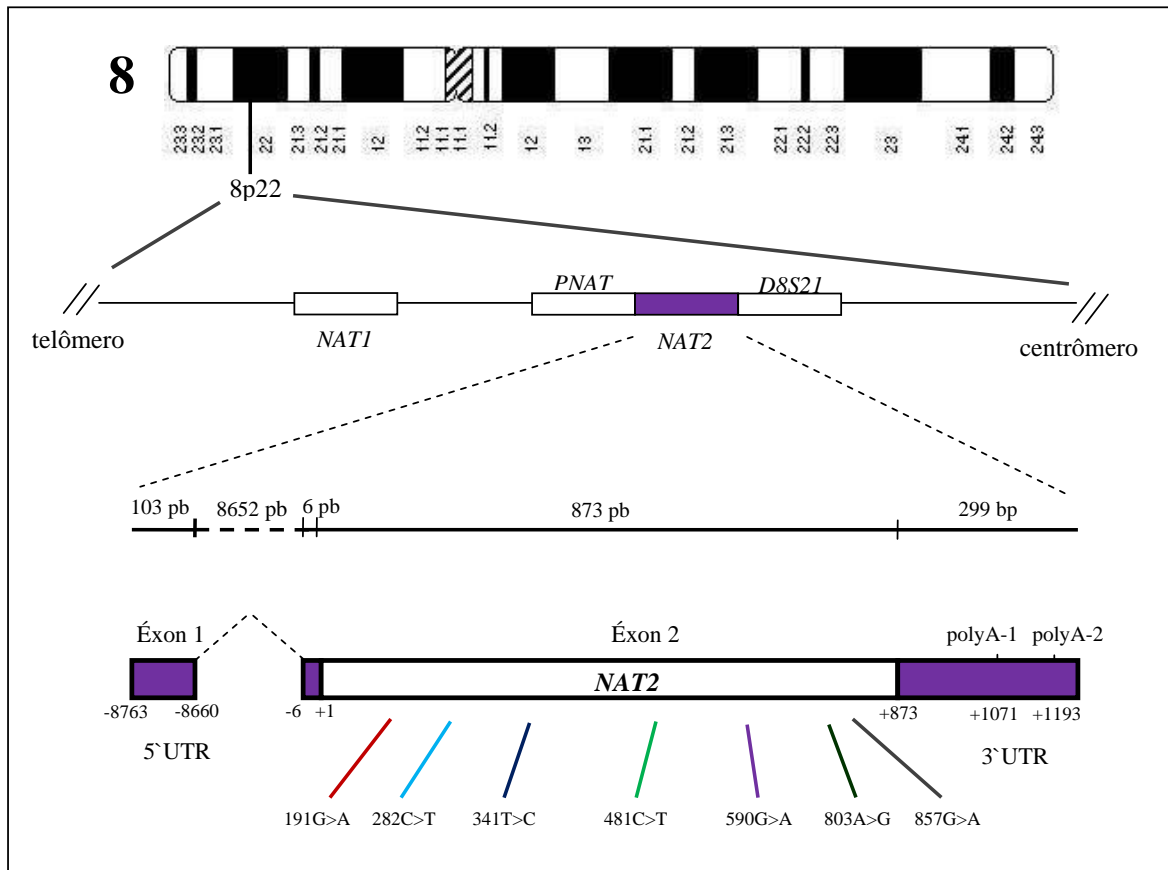


Figura 1.10: Localização cromossômica dos *loci* das N-acetiltransferases humanas. Esquema mostrando os SNPs mais frequentes encontrados no gene *NAT2* humano. *D8S21* representa um marcador polimórfico encontrado dentro no *locus* de *NAT2* (Adaptado a partir de Sim *et al.*, 2000 e Boukouvala & Sim, 2005).

Os alelos de *NAT2* decorrem fundamentalmente de diferentes haplótipos de sete mutações *missense* (G191A, T341C, A434C, G590A, A803G, A845C e G857A) e cinco mutações silenciosas (T111C, C282T, C481T, C759T e A803G) na região codificante de *NAT2* (Hein *et al.*, 2000). A genotipagem dos sete SNPs mais frequentes identificados em diferentes populações humanas (191 G>A (R64Q), 282 C>T (silenciosa), 341 T>C (I114T), 481 C>T (silenciosa), 590 G>A (R197Q), 803 A>G (K286T) e 857 G>A (G286T)) é altamente preditiva do fenótipo como determinada *in vivo* com drogas sonda (Sabbagh & Darlu, 2006; Rihs *et al.*, 2007).

O alelo *NAT2* tipo selvagem, designado *NAT2**4, não tem essas substituições e está associado com o fenótipo de acetilação rápida. Os alelos *NAT2* contendo os SNPs 191G>A, 341T>C, 590G>A ou 857G>A estão associados com a acetilação lenta (nat.mbg.duth.gr).

Diferentes estudos de expressão gênica e atividade enzimática possibilitaram a caracterização quanto ao perfil de acetilação dos alelos mais comuns em populações humanas



e constataram que os fenótipos de acetilação lenta contêm um ou mais destes alelos identificados como *NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7* e *NAT2*14* e os seus subtipos. Os alelos *NAT2*12* e *NAT2*13* foram associados com fenótipo de acetilação rápida, similar ao tipo selvagem. Entretanto, o alelo **12D*, com um polimorfismo adicional (364 G>A), codifica uma proteína instável conferindo o fenótipo de acetilação lenta (Zang *et al.*, 2007a; 2007b; Sabbagh *et al.*, 2011; Hein & Doll, 2012).

Diferentes estudos realizados em populações distintas mostraram que a distribuição dos alelos que codificam para *NAT2* apresenta diferenças de acordo com a etnia da população. Por exemplo, a mutação 191G>A, que caracteriza o grupo de alelos **14*, está presente nas populações americanas de origem africana, e em populações africanas nativas. Os alelos *NAT2*5A*, *NAT2*5B*, *NAT2*5C*, *NAT2*6A* e *NAT2*7B* representam 99% dos alelos mutantes em acetiladores lentos nas populações descendentes de europeus. Na população europeia, esse fenótipo de acetilação lenta apresenta uma frequência superior a 50%. Nas populações asiáticas, o fenótipo de acetilação rápida é predominante sendo representado pelo alelo selvagem *NAT2*4*.

A presença de diferentes polimorfismos em *NAT2* pode ser facilmente determinada por procedimentos de genotipagem tais como PCR-RFLP (Cascorbi *et al.*, 1995), PCR alelo específico (Lin *et al.*, 1993) ou sequenciamento direto (Teixeira *et al.*, 2007). Para encontrar o genótipo de cada indivíduo e prever o fenótipo, o haplótipo de ambos os cromossomos é usualmente reconstruído usando o software PHASE (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003). Usando os dados do haplótipo, muitos estudos têm reportado as frequências de diferentes perfis de acetilação entre populações etnicamente diferentes mostrando a alta diversidade ao redor do mundo. A base molecular para tais discrepâncias é que o alelo *NAT2* mais comum em euro-descendentes é muito raro em asiáticos e pode representar uma vantagem seletiva diferente dentro dos conjuntos gênicos dessas populações separadas. A descrição de novos alelos ainda continua ocorrendo em estudos recentes (Teixeira *et al.*, 2010).

Na tentativa de estabelecer uma associação entre os perfis de acetilação e o desenvolvimento de doenças, estudos de coorte ou caso-controle tem sido realizados usando ferramentas de genotipagem e fenotipagem.

Há uma extensa literatura sobre a variação étnica dos alelos *NAT* e frequência do genótipo. Metodologias envolvendo genotipagem, assim como a diversidade de polimorfismos e alelos que têm significado funcional, tornam a comparação entre os estudos mais difícil. Cascorbi e Roots (1999) e Hein e colaboradores (2000) descrevem sobre o



desafio ao método que levam ao genótipo e fenótipo e, portanto deduzem má classificação para ambos *NAT1* e *NAT2*. É difícil comparar a acurácia de diferentes métodos de fenotipagem para *NAT2* ou diferentes pontos de corte usando o mesmo método de fenotipagem. Além disso, para genotipagem, os investigadores algumas vezes selecionam um pequeno número de SNPs para definir o perfil de acetilação (Roy *et al.*, 2001; Vuilleumier *et al.*, 2006). Desde que as frequências dos alelos *NAT2* são diferentes entre as populações ao redor do mundo e novos alelos estão sendo caracterizados em alguns países, os investigadores precisam caracterizar tais alelos em sua própria população de modo a escolher SNPs apropriados para genotipagem e classificação do perfil de acetilação dos indivíduos; caso contrário, a superestimação de acetiladores lentos pode ser obtida, contribuindo para resultados espúrios no estudo de associação (Agúndez *et al.*, 2008).

Contudo, a triagem de pacientes para polimorfismos genéticos de *NAT2* pode revelar-se clinicamente útil para a predição e prevenção de reações adversas em pacientes fazendo uso de drogas que sejam metabolizadas por esta enzima.

1.9- Citocromo P450

As enzimas do complexo citocromo P450 (CYP450) são hemeoproteínas que foram descritas por Garfinkel e Kligenberg em 1958 e nomeadas, em 1961, devido ao seu pigmento (P) com 450nm de espectro (Garfinkel & Kligenberg, 1958). Elas formam o grupo enzimático mais importante para biotransformação de fase I. A principal atividade das enzimas do sistema CYP450 é a oxidação e elas estão localizadas no retículo endoplasmático liso, principalmente nas células do fígado. No entanto, estas mono-oxigenases estão também localizadas no intestino, pâncreas, cérebro, pulmões, rins, mama, placenta, baço, medula óssea, epitélio nasal e da pele, ovário e testículos (Wijnen *et al.*, 2007).

As CYPs450 são responsáveis pela metabolização de vários substratos endógenos e apresentam também um importante papel na síntese de lipídios hidrofóbicos tais como: colesterol, hormônios esteróides, ácidos biliares e ácidos graxos; e no metabolismo da vitamina D (Paine *et al.*, 2006). Além disso, algumas enzimas do complexo metabolizam substâncias exógenas incluindo drogas, produtos químicos ambientais, poluentes bem como produtos derivados de plantas. O metabolismo de substâncias exógenas por CYP450 usualmente resulta em detoxificação de xenobióticos; no entanto, as reações dirigidas por tais enzimas podem conduzir à geração de metabólitos tóxicos que contribuem para aumentar o risco de desenvolvimento de cânceres e outros efeitos tóxicos (Nerbert DW & Russel DW, 2002).



O sequenciamento completo do genoma humano revelou a presença de cerca de 115 genes de *CYP450*, incluindo 57 genes ativos e 58 pseudogenes e são responsáveis por 94% das drogas biotransformadas no fígado (Ingelman-Sundberg & Rodriguez-Antona, 2005, Kalra, 2007).

A família CYP450 em humanos, especificamente as famílias 1-3, são responsáveis por 70-80% de toda a biotransformação dos fármacos usados clinicamente, dependentes de fase I, e pela metabolização de um grande número de xenobióticos. Além disso, mais de 50% de toda eliminação dos fármacos utilizados em algum regime terapêutico pode ser atribuído a uma ou mais isoenzimas do sistema CYP450. Aproximadamente 200.000 substâncias químicas são biotransformadas pelas enzimas desta família. Através de diferentes metodologias, cerca de 1200 enzimas do citocromo 450 já foram isoladas e sequenciadas (Lewis, 2001).

Os estudos conduzidos por Shimada e colaboradores (1994), utilizando euro-descendentes, americanos e japoneses, caracterizaram as isoenzimas mais abundantes do sistema CYP450 encontradas no fígado humano adulto. Dessa maneira, foi observado que CYP2A6 está presente em 6%, CYP2D6 2%, CYP2B6 < 1%, a família CYP3A (3A4 e 3A5) em maior parte com 39%, a família CYP2C (2C8, 2C9, 2C18 e 2C19) com 25%, CYP1A2 (18%) e por fim CYP2E1 com 9%. As outras isoformas contribuem em menor quantidade em relação a todas as isoenzimas do CYP (Shimada *et al.*, 1994).

A fim de identificar qual isoenzima do sistema P450 é responsável pela biotransformação de um determinado fármaco, várias abordagens têm sido desenvolvidas, incluindo: derivados metabólicos de microsossomos de enzimas de cDNA expressas; uso de inibidores seletivos com microsossomos; imunoinibição do CYP por anticorpos anti-P450 de isoformas específicas em microsossomos; correlação entre a formação de metabólitos de fármacos candidatos com várias atividades das isoformas específicas do P450 em um painel de microsossomos do fígado (Kalra, 2007).

1.9.1- Nomenclatura

O sistema de nomenclaturas das proteínas do sistema P450 é baseado na sequência protéica e filogenia. Elas são nomeadas em ordem cronológica de acordo com a submissão ao comitê de nomenclaturas, como ilustrado na figura 1.11 (Nelson *et al.*, 1996).

As proteínas CYP450 são agrupadas em famílias e subfamílias de acordo com a similaridade entre as sequências de aminoácidos, onde membros da família têm $\geq 40\%$ de identidade em sequência de aminoácidos e membros da mesma subfamília apresentam $\geq 55\%$ de identidade.

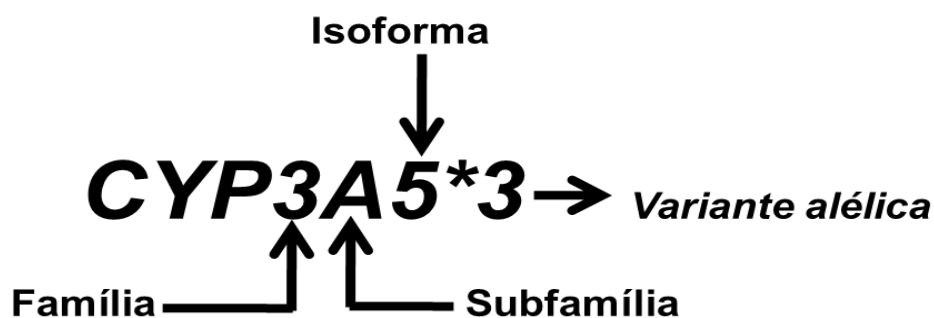


Figura 1.11: Nomeando uma isoenzima do citocromo P450.

As famílias do sistema CYP P450 de mamíferos podem ser divididas funcionalmente em duas classes maiores: aquelas que envolvem a biossíntese de esteróides e ácidos biliares, e aquelas que realizam a biotransformação de xenobióticos. As três principais famílias do sistema CYP P450 (CYP1, CYP2 e CYP3) são responsáveis pela maioria da biotransformação hepática de fármacos. A família dos genes que codificam para as enzimas do sistema CYP1 e CYP3 (CYP1A, CYP1B e CYP3A) é relativamente simples, enquanto a que codifica para as enzimas do sistema CYP2 é dividida em muitas subfamílias (CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, etc.). Esta constitui a maior família de isoenzimas e compreende um terço de todas as CYPs humana. Estas isoformas têm o mesmo centro oxidativo, mas diferem em suas estruturas protéicas (Lin *et al.*, 1998).

Cada uma das isoformas tem uma ampla especificidade de substrato, mas cada uma tem o seu próprio perfil de substrato específico. Isto possibilita que toda a gama de estruturas químicas seja metabolizada. Estas isoformas têm mecanismos reguladores diferentes para controlar sua atividade. Os mecanismos de regulação envolvem produtos químicos que induzem ou inibem a enzima. Por exemplo, CYP1A2 metaboliza alguns alcatrões carcinogênicos na fumaça do cigarro e é induzido por estes produtos. Membros de outras famílias de genes CYP são induzidos por drogas tais como barbitúricos, anticonvulsivantes e rifampicina.

Além de mostrar algum grau de seletividade de substrato, as isoformas individuais também mostram seletividade para inibidores. Por exemplo, sulfafenazol é um inibidor específico de CYP2C9 enquanto a quinidina é um potente e seletivo inibidor da isoforma CYP2D6.

Algumas isoformas exibem polimorfismos genéticos. As frequências desses polimorfismos diferem marcadamente entre grupos étnicos. Essas diferenças genéticas significam que algumas pessoas têm uma enzima com reduzida ou nenhuma atividade. Ao todo, quatro fenótipos, baseados no genótipo, podem ser identificados: i) metabolizadores



lentos, que apresentam baixa atividade enzimática, ii) metabolizadores intermediários, usualmente heterozigoto para o alelo defeituoso, iii) metabolizadores rápidos, que tem dois alelos normais e iv) metabolizadores ultra-rápidos, que têm várias cópias do gene (Ingelman-Sundberg M, 2004). Pacientes que são metabolizadores lentos podem ter um aumento de risco de reações adversas para uma droga que seja metabolizada pela enzima afetada.

O fígado é o principal sítio de metabolismo. No entanto, as isoformas podem ser encontradas em muitos tecidos e CYP3A4, em particular, é encontrada em concentrações bastante elevadas na mucosa do intestino delgado. Isto significa que o substrato de drogas para essa isoforma são metabolizados durante a absorção, enquanto eles estão passando pela mucosa do intestino delgado, e durante a sua primeira passagem através do fígado. Interações medicamentosas graves resultaram na retirada de mibefradil (um bloqueador dos canais de cálcio do tipo T que inibe CYP3A4) por causa das mortes que ocorrem a partir da administração concomitante de medicamentos que são substratos do CYP3A4 (Garcia-Martin, 2002).

Serão abordados a seguir a influência e as implicações dessas variantes genéticas nas isoformas de CYP 450 envolvidas no metabolismo da dapsona no tratamento da hanseníase.

1.9.2- Genética molecular da mono-oxigenase CYP2E1

A enzima CYP2E1 é expressa principalmente no fígado, mas pode ser encontrada em outros órgãos tais como rins, trato gastrointestinal e cérebro. Ela está envolvida na oxidação de substratos de baixo peso molecular, principalmente etanol, acetona e nitrosaminas e é, portanto, de maior interesse do ponto de vista toxicológico e carcinogênese (Guengerich, 1991). Além de etanol, CYP2E1 pode ser induzida por várias drogas tais como isoniazida, dapsona, mas também por hidrocarbonos, benzeno, clorofórmio e vários solventes orgânicos (Caro & Cederbaum, 2004).

A atividade de CYP2E1 é também modulada por polimorfismos em várias localizações de seu gene e uma maior atividade desta enzima pode aumentar a síntese de hepatotoxinas. Vários polimorfismos têm sido descritos (McBride, 1987; Kelsell *et al.*, 1990). A maioria deles ocorre em *introns* e parece não ter significância funcional. No entanto, dois polimorfismos acima do sítio de início de transcrição do gene, que são caracterizados por restrição com *Pst I* e *Rsa I*, parecem estar em completo desequilíbrio de ligação (LD) (Figura 1.12). Esses dois polimorfismos estão localizados em um suposto sítio de ligação de HNF-q e assim podem desempenhar uma função na regulação da transcrição de *CYP2E1* e conseqüentemente na expressão da proteína (Watanabe *et al.*, 1994). Os genótipos de



CYP2E1, por análise de restrição com *Rsa I*, são classificados como sendo **1A/*1A*, **1A/*5* e **5/*5*. Um polimorfismo no intron 6 de *CYP2E1*, (**6*) (7632 T>A), que é detectável com a enzima de restrição *Dra I* e está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo *Rsa I*, pode ser de importância na determinação da suscetibilidade ao câncer de pulmão (Uematsu *et al.*, 1991). Estas descobertas podem refletir ligação para o polimorfismo *Rsa I* ou outro polimorfismo funcionalmente significativo, em vez de um efeito *per se* do polimorfismo *Dra I*. O outro polimorfismo é uma inserção/deleção de 96 pb (alelos *CYP2E1*1D* e **1C*) que regula a expressão do gene (www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm). Alguns estudos têm mostrado que as variantes alélicas *CYP2E1 *5*, **6* e **1D* aumentariam a atividade da enzima (Watanabe *et al.*, 1994; Carriere *et al.*, 1996). No entanto, outros autores não confirmaram alguma relação com estes polimorfismos com a atividade de *CYP2E1* (Powell *et al.*, 1998). Os estudos mostraram que a frequência de SNPs -1053 C>T na região promotora varia significativamente em diferentes grupos étnicos. O alelo mutante está presente com uma frequência de 2-8% em euro-descendentes, mas varia na Ásia de 25-36% (Neuhaus *et al.*, 2004).

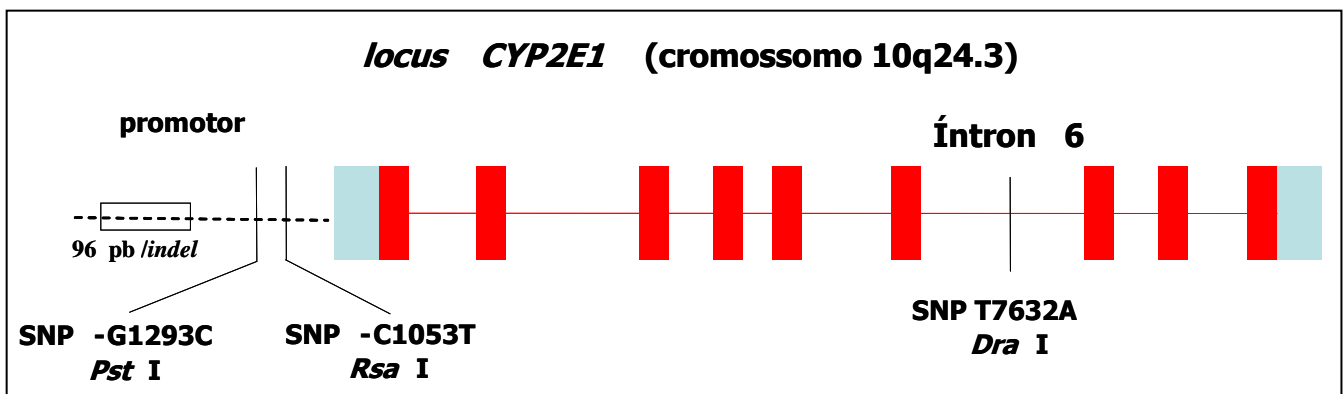


Figura 1.12: Localização dos polimorfismos no *locus* de *CYP2E1* e as respectivas enzimas de restrição utilizadas para detectar os diferentes genótipos (adaptado a partir de Roy *et al.*, 2008).

Vários estudos têm mostrado associação do genótipo selvagem **1A/*1A* com risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida por droga anti-tuberculose (Huang *et al.*, 2003; Vuilleumier *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2006; Singla *et al.*, 2014). No entanto, essa associação não foi observada por investigadores em outras populações (Cho *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2013). A discrepância desses resultados pode ser devida a diferenças nas frequências dos alelos *CYP2E1*1A* e *CYP2E1*5* entre as populações e os critérios usados para definir hepatotoxicidade.

Em 1995, Mitra e colaboradores identificaram a formação de hidroxilamina dapsona, um metabólito tóxico, catalisada por *CYP2E1* em concentrações clinicamente apropriadas de



dapsona. Contudo, nenhum estudo de associação com esta isoforma e reações adversas em pacientes em tratamento com esta droga foi publicado.

1.9.3- Subfamília CYP3A

A subfamília CYP3A foi primeiramente caracterizada por Elshourbary e Guzelian em 1980. Ela é uma das mais versáteis do sistema de biotransformação que facilita a eliminação de drogas, outros compostos xenobióticos e moléculas endógenas do corpo. Embora não tenha havido uma análise sistemática da extensão da sua contribuição, é geralmente aceito que as enzimas CYP3A desempenham uma função dominante na eliminação metabólica de mais drogas que qualquer outra enzima de biotransformação. A versatilidade metabólica de CYP3A pode ser devido a um grande sítio ativo que permite a ligação de moléculas estruturalmente diversas (Guengerich, 1999). Além disso, enzimas CYP3A são conhecidas por acomodar múltiplos ligantes (diferentes moléculas ou duas ou mais da mesma molécula) no sítio ativo. Este fenômeno pode resultar em melhora na formação do produto (ativação) ou formação do produto reduzida (inibição não competitiva), dependendo da concentração do substrato e natureza do segundo ou terceiro ligante. (Korzekwa *et al.*, 1998).

Há uma vasta e crescente literatura sobre depuração de droga mediada por CYP3A. Ela tem sido desenvolvida, em parte, por causa da importante contribuição de CYP3A no metabolismo de primeiro passo e reduzida biodisponibilidade sistêmica de drogas oralmente administrada (Thummel & Wilkinson, 1998), e também como uma consequência da suscetibilidade de CYP3A aos efeitos de numerosas drogas que inibem ou induzem sua atividade catalítica (Guengerich, 1997; Thummel & Wilkinson, 1998; Kalra, *et al.*, 2007).

Sendo assim, esta subfamília é responsável pela biotransformação de aproximadamente 60% dos fármacos utilizados na prática clínica. Ela está localizada no cromossomo 7 e apresenta quatro isoformas: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43. Em adultos, a CYP3A4 é a CYP3A dominante e é encontrada no fígado e intestino delgado. CYP3A5 também é encontrada no fígado adulto e intestino delgado (e outros órgãos), mas sua expressão é claramente polimórfica, com indivíduos exibindo um nível relativamente alto ou baixo de proteína (Wrighton *et al.*, 1990; Paine *et al.*, 1997). A CYP3A7 é a principal isoenzima detectada no embrião humano, no feto, e no fígado de recém nascidos, podendo ser detectada também no fígado humano adulto, em uma concentração bem menor se comparada a CYP3A4. A CYP3A43 foi detectada no fígado, rins, próstata e pâncreas, mas o nível de mRNA no fígado foi muito menor que para CYP3A4.



1.9.3.1- Genética molecular da mono-oxigenase CYP3A4

A CYP3A4 é a principal isoforma da subfamília CYP3A no fígado humano, tanto na especificidade do substrato quanto na quantidade de proteína. Ela compõe cerca de 30% do total de proteínas hepáticas do sistema CYP450 e altas concentrações desta proteína já foram encontradas no epitélio do duodeno e nos rins (Gashaw *et al.*, 2003). CYP3A4 exibe uma ampla especificidade de substrato e está aparentemente envolvida no metabolismo de mais de 50% de todas as drogas utilizadas em seres humanos (Bertz & Granneman, 1997).

O gene *CYP3A4*, que codifica para esta isoforma, é altamente polimórfico, com mais de 35 SNPs descritos de acordo com o site de nomenclatura (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>). Geralmente, variantes na região codificante de *CYP3A4* ocorrem em frequências <5% e aparecem em heterozigose com o tipo selvagem. Estas variantes na região codificante podem contribuir, mas não são a principal causa de diferenças interindividuais na depuração dependente de CYP3A, por causa da baixa frequência e alterações limitadas na expressão ou função catalítica da enzima. Ao contrário de outros genes humanos P450s (por exemplo, *CYP2D6* e *CYP2C19*), não há evidência de alelo nulo para *CYP3A4*. Esse gene está localizado no cromossomo 7q22.1 e possui 13 exons (Burk *et al.*, 2004). Sua indução é mediada pelo receptor PXR que interage com o receptor RXR (Retinoide X receptor) e outros fatores transcricionais que se ligam ao promotor permitindo a transcrição do gene.

A atividade da enzima CYP3A4 é modulada pela presença de polimorfismos em vários sítios ao longo do gene (Figura 1.13); alguns estudos descrevem que esta enzima apresenta uma limitação em termos de variação pelo fato de metabolizar componentes endógenos. Desta maneira, alguns estudos têm sido baseados em busca de novas variantes alélicas com importância funcional; dentre as já descritas, algumas codificam para proteínas com atividade reduzida (*6, *17 e *20). Embora o número de estudos reportado seja pequeno, em alguns casos a frequência de variantes codificantes é mais baixa em caucasianos comparada a outros grupos étnicos. Algumas das variantes codificantes identificadas em caucasianos (*CYP3A4**8, *9, *11, *12, *13 e *15) apareceram em uma frequência alélica menor que 1%. As variantes codificantes mais comuns reportadas para caucasianos são: *CYP3A4**2 (2,7%) (Sata *et al.*, 2000), *CYP3A4**10 (0,24-2%) (Eiselt *et al.*, 2001; Lamba *et al.*, 2002a) e *CYP3A4**17 (2%) (Daí *et al.*, 2001), enquanto para: Africanos Americanos *CYP3A4**15A (2-4%) (Dai *et al.*, 2001; Lamba *et al.*, 2002a); Mexicanos *CYP3A4**16 e *CYP3A4**10 (5%) (Lamba *et al.*, 2002a) e Japoneses *CYP3A4**16 (5%) (Lamba *et al.*, 2002b). A baixa frequência desses alelos, bem como a baixa variabilidade interindividual na atividade enzimática sugere que a



variação genética responsável por esta variabilidade deve estar localizada em outra parte do gene *CYP3A4* ou em fatores transcripcionais (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

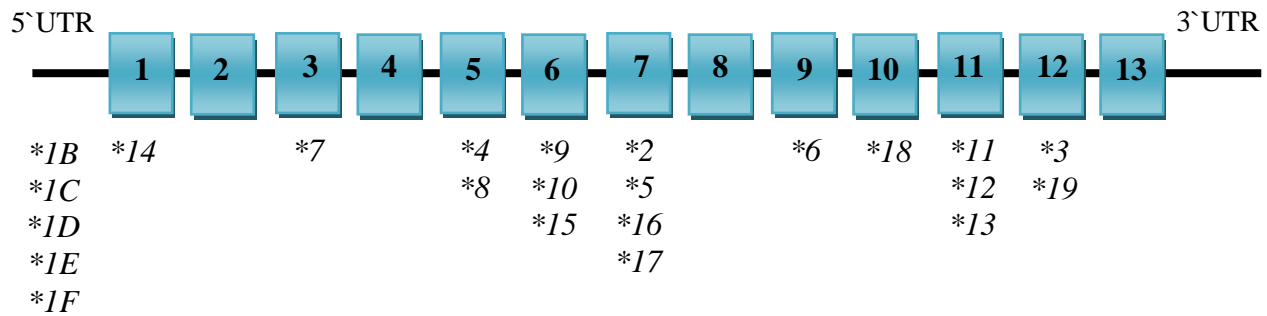


Figura 1.13: Distribuição das mutações no gene *CYP3A4* (Lamba *et al.*, 2002a).

Cinco diferentes SNPs na região regulatória do gene foram identificados (Gonzalez *et al.*, 1988). De longe, o mais comum e melhor caracterizado é o alelo *CYP3A4*1B*. O SNP que caracteriza esta alelo consiste de uma transição A-392G (transição de A>G na posição -392 da região promotora) em uma região específica do fator de transcrição nifedipina (NFSE) e acredita-se que este SNP esteja relacionado com a regulação da expressão gênica ou diminuição da atividade enzimática de *CYP3A4*. A frequência do alelo *CYP3A4*1B* varia entre diferentes grupos étnicos: 0% em tailandeses, chineses, chineses americanos e japoneses americanos (Walker & Jaffe, 1998; Ball *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2001); 2-9,6% em caucasianos (Walker & Jaffe, 1998; Ball *et al.*, 1999; Kuehl *et al.*, 2001; Garcia-Martin *et al.*, 2002); 9,3-11% em hispânicos americanos (Ball *et al.*, 1999; Paris *et al.*, 1999) e 35-67% em africanos americanos (Walker & Jaffe, 1998; Ball *et al.*, 1999; Sata *et al.*, 2000; Kuehl *et al.*, 2001; Lamba *et al.*, 2002). As outras variantes na região promotora do gene parecem estar em menor frequência entre os caucasianos: *CYP3A*1C* (1%), *CYP3A*1D* (1%), *CYP3A*1E* (<1%) e *CYP3A4*15B* (<1%) (Kuehl *et al.*, 2001; Hamzeiy *et al.*, 2002), com a exceção de *CYP3A4*1F* (20%) (Hamzeiy *et al.*, 2002). Os alelos *CYP3A4*1C* e *CYP3A4*1D* não foram detectados em africanos americanos (Kuehl *et al.*, 2001).

Dos cinco SNPs identificados no promotor, somente o alelo *CYP3A4*1B* tem sido estudado para avaliar o efeito da mutação na atividade transricional e atividade catalítica *in vivo*. Um estudo conduzido por Amirimani e colaboradores (1999), usando gene repórter em linhagens de células de câncer de mama, demonstrou que a expressão do mutante G-392 ocorreu em rato e foi 1,4 a 1,9 vezes mais alto que o observado para o tipo selvagem A-392. Esta descoberta é sustentada por uma observação de níveis mais altos (1,6 a 2,1 vezes) de oxidação de nifedipina e proteína *CYP3A4* no fígado humano em indivíduos carregando pelo



menos um alelo variante G-392, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Ando *et al.*, 1999). Ball e colaboradores. (1999) não encontraram diferenças na taxa média de dimetilação de eritromicina ou média de depuração de nifedipina oral em indivíduos com homozigose A-392 ou homozigose G-392 para o genótipo *CYP3A4*. Outro estudo conduzido por Wandel e colaboradores (2000) verificou o efeito do alelo *CYP3A4*1B* e a disposição oral e intra venosa (i.v.) de midazolam na atividade hepática e intestinal da enzima CYP3A, em africanos americanos e caucasianos americanos. Embora não tenham encontrado relação entre o genótipo e depuração de midazolam oral, houve menor depuração sistêmica 30% para sujeitos homozigotos para o alelo G-392 quando comparado aqueles tipo selvagem A-392. Contudo, a distribuição dos genótipos *CYP3A*1B* não foi balanceada para cada grupo étnico (Wandel *et al.*, 2000). Em outro estudo, realizado por Von Ahnsen e colaboradores (2001), em uma coorte de pacientes que sofreram transplante renal e faziam uso de ciclosporina, nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis de ciclosporina no sangue/dose oral, entre os pacientes com os genótipos G-392/A-392 (Von Ahnsen *et al.*, 2001). Outro estudo para avaliar o alelo *CYP3A4*1B* em relação genótipo/fenótipo foi conduzido por Garcia-Martin e colaboradores (2002) em uma população caucasiana na Espanha. Em seu estudo, sobre a atividade N-demetilação dextrometorfano refletida pela razão de dextrometorfano/3-metoxymorfina na urina, os investigadores não encontraram diferença significativa entre indivíduos que eram heterozigotos ou homozigotos para o alelo G-392 e aqueles homozigotos para o tipo selvagem A-392 (Garcia-Martin *et al.*, 2002).

Em sua publicação original, Rebbeck e colaboradores (1998) notaram que pacientes africanos americanos com câncer de próstata eram, em sua maioria, homozigotos para o alelo mutante *CYP3A4*1B* quando comparados aos controles saudáveis. Esta descoberta foi confirmada por Paris e colaboradores (1999) em seu estudo com homens africanos americanos com câncer de próstata e mais adiante por Tayeb e colaboradores (2002) em um estudo envolvendo homens caucasianos com hiperplasia prostática benigna que passou a desenvolver câncer de próstata. Rebbeck e colaboradores. (1998) também reportaram que indivíduos em homozigose *CYP3A4*1B* tipo selvagem estavam em maior risco de desenvolver leucemia secundária depois do tratamento de câncer primário com terapia com epipodofillotoxina que indivíduos com o genótipo *CYP3A4*1B* mutante. A razão de chance (OR) para a associação do genótipo *CYP3A4*1B* entre os casos relacionados com o tratamento foi significativamente menor que um (0,07; 95% CI, 0,01-0,08).



Embora os dados clínicos indiquem convincentemente que haja uma associação entre o polimorfismo *CYP3A4*1B* e risco de doença/ toxicidade ao tratamento, a falta de provas convincentes *in vivo* para sonda *CPY3A* alterada e disposição do substrato para o genótipo *CYP3A4*1B* sugere a possibilidade de desequilíbrio de ligação entre *CYP3A4*1B* e outras mutações genéticas que podem influenciar o fenótipo clínico, sendo um dos genes candidatos a essa hipótese, o *CYP3A5* (Park *et al.*, 2012).

1.9.3.2- Genética molecular da mono-oxigenase CYP3A5

O gene que codifica para a *CYP3A5* está localizado na mesma região que o *CYP3A4*, no cromossomo 7q22.1, juntamente com mais dois genes da subfamília *CYP3A*, isoformas *CYP3A7* e *CYP3A43* (Burk *et al.*, 2004). A sobreposição de especificidade dos substratos entre *CYP3A4* e *CYP3A5* dificulta a distinção em termos de biotransformação destas duas enzimas (Hiratsuka *et al.*, 2002). Além disso, a expressão de *CYP3A5* é polimórfica em adultos sendo detectável em cerca de 10-20% em caucasianos, 33% em japoneses e 55% em africanos americanos (Lamba *et al.*, 2002). Entre os que expressam *CYP3A5*, o percentual que contribui para o total da proteína hepática por esta isoforma ainda não está claro, com estimativas variando entre 17 a 50%. Esta isoforma é também expressa numa variedade de tecidos extrahepáticos (Daly, 2006).

O gene que codifica para *CYP3A5* também apresenta uma variedade genética. A sequência de cDNA de *CYP3A5* foi descrita pela primeira vez de forma independente por Aoyama e colaboradores 1989 e Schuetz e colaboradores. 1989. O alelo correspondente a este cDNA (*CYP3A5*1*) apresenta uma alta expressão da proteína e foi denominado tipo selvagem (Aoyama *et al.*, 1989; Schuetz *et al.*, 1989).

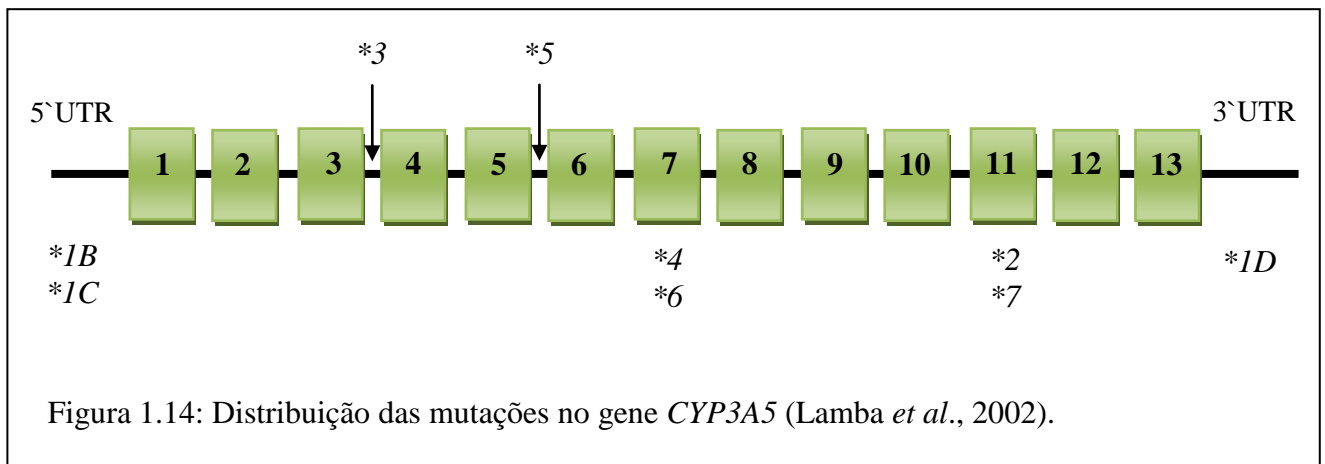
O primeiro relato de um SNP na região codificante do gene *CYP3A5* potencialmente importante veio de Jounaïdi e colaboradores (1996), em seu estudo pioneiro com fígados obtidos de doadores caucasianos. Estes investigadores descreveram uma transversão na posição C1280A no exon 11, caracterizando o alelo (*CYP3A5*2*). A frequência do alelo *CYP3A5*2* em caucasianos foi relatada como 1,9% (Hustert *et al.* 2001), mas não foi vista em outros estudos em outras populações (Kuehl *et al.* 2001).

Em sua publicação, Jounaïdi e colaboradores (Jounaïdi *et al.*, 1996) sugeriram que a alteração de aminoácido resultante, T398A, pode afetar a estabilidade da proteína sendo responsável pela redução do conteúdo protéico *CYP3A5* hepático. Outras mutações na região codificante foram relatadas (Q200R, H30Y, S100Y), mas todas com uma frequência de alelos



relativamente baixa (Hustert *et al.* 2001; Chou *et al.* 2001). O significado funcional destas mutações é desconhecido.

Outro estudo conduzido por Kuehl e colaboradores demonstrou que o mais frequente e funcionalmente importante SNP no gene *CYP3A5* consiste de uma transição A6986G dentro do intron 3 (*CYP3A5*3*) (Figura 1.14) (Kuehl *et al.*, 2001). Essa mutação cria um sítio de *splicing* alternativo no pré-RNA mensageiro com a produção aberrante (SV1-RNAm), contendo 131pb na sequência do intron 3 (exon 3B) inserido entre o exon 3 e o exon 4 (Lamba *et al.* 2002). No exon 3B, a inserção resulta na mudança da fase de leitura e consequentemente, em uma proteína truncada com 102 aminoácidos. O alelo *CYP3A5*3* é o mais frequente e é comumente associado com a ausência da proteína *CYP3A5* sendo encontrado em diferentes grupos étnicos (Daly, 2006) embora ele esteja presente em frequências alélicas diferentes. Neste caso, o alelo variante é mais prevalente que o alelo tipo selvagem para maioria das populações. A frequência do alelo tipo selvagem (A6986) é reportada como 5-15% para caucasianos e 45-73% para africanos americanos (Kuehl *et al.*, 2001; Hustert *et al.*, 2001). Hustert e colaboradores também reportaram a frequência deste alelo em chineses de 27% e em coreanos de 30% (Hustert *et al.* 2001). A disponibilidade desses dados sugere significativa diversidade genética para o alelo *CYP3A5*1* que pode ter consequências clínicas importantes em diferentes etnias (Lamba *et al.* 2002).



Há também mutações descritas dentro do intron 4 e intron 5 no gene *CYP3A5* que são capazes de criar “*splicing* alternativo” que podem afetar a síntese do RNAm funcional (SV2 e SV3) (Kuehl *et al.* 2001). No entanto, essas mutações mais raras sempre têm sido encontradas em combinação com o SNP do intron 3, e assim representa haplótipos *CYP3A5*3* (*3A, *3B e *3C). Outras mutações que resultam em *splicing* defeutivo têm sido reportadas (Figura 1.14). A transição G14690A no exon 7 vista inicialmente em africanos americanos resulta na deleção do exon 7 (alelo *CYP3A5*6*) e consequentemente na síntese da proteína (Kuehl *et al.*



2001; Hustert *et al.* 2001). O alelo *CYP3A5*5* foi descrito em chineses (Chou *et al.* 2001) e representa uma transição T12952C (sítio de *splicing* do intron 5) que resulta em múltiplos *splicings* alternativos e presumivelmente diminui o acúmulo de proteína. O alelo *CYP3A5*7* representa uma inserção de base no exon 11 (27131-32 insT) resultando em mudança de fase de leitura e um códon de parada e conseqüentemente em uma proteína truncada (Hustert *et al.* 2001; Chou *et al.* 2001). Ambos variantes *CYP3A5*6* e *CYP3A5*7* ocorrem em uma frequência alélica relativamente baixa em caucasianos e chineses, mas são relativamente comuns entre africanos americanos (10-13%). Embora Gill e colaboradores (Gill *et al.*, 1995) tenham relatado a importância das enzimas CYP3A na N-hidroxilação da dapsona nenhum estudo de associação de polimorfismos genéticos nesses genes *CYP3A* com desfecho de reações adversas associado com administração de dapsona foi realizado.



2. Justificativa

Sabe-se hoje que a influência do “background” genético nas variações interindividuais em relação à resposta terapêutica é fundamental. Polimorfismos em genes metabolizadores de drogas podem influenciar em diversos níveis a atividade biológica final da enzima levando ao aparecimento de desfechos desfavoráveis. Outro fator fundamental relacionado à diversidade genética é a etnia da população. A frequência dos principais polimorfismos funcionais varia amplamente dependendo da etnia predominante numa determinada população e, portanto, os padrões e resposta a uma determinada droga também variam. O Brasil, devido a sua característica parental tri híbrida com participação das etnias caucasiana, negróide e ameríndia, possui uma grande mistura de etnias, as quais se distribuem por todo o território nacional com predomínio de alguns grupos étnicos dependendo da região. Em humanos, a enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2), codificada pelo gene *NAT2* é primordial para a biotransformação (acetilação) de diversas drogas, dentre as quais, a dapsona, usada no tratamento da hanseníase. Adicionalmente, as hidroxilases do citocromo P450, basicamente as subfamílias CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5 e CYP2C9 estão diretamente associadas à metabolização da dapsona, entre outras drogas. Tendo em vista a diversidade alélica desses genes de acordo com a etnia, é de se esperar que os perfis fenotípicos de acetilação e hidroxilação também variem.

Atualmente, o tratamento da hanseníase se baseia em um esquema de poliquimioterapia preconizado pela OMS (PQT/OMS), onde a dapsona, anteriormente utilizada num esquema de monoterapia, está associada a rifampicina (RMP) e a clofazimina (CFZ) em esquemas associados de acordo com a classificação clínica do paciente. Esta combinação normalmente apresenta uma boa eficácia na maioria dos pacientes. Contudo, a ocorrência de reações adversas associadas à intolerância às drogas tem se tornado muito frequente com apresentações clínicas diferenciadas sendo a dapsona a maior causa destas reações (70,7%). Dentre as ADRs induzidas pela dapsona, a anemia hemolítica merece destaque pois acarreta sérios efeitos, principalmente em crianças, idosos e pessoas com deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), enzima responsável por catalisar uma das principais vias alternativas no processo de obtenção de energia pela célula e crucial para a proteção das hemácias contra o processo oxidativo.

Sendo a hanseníase uma doença endêmica tratada com um esquema poliquimioterápico, padronizado e normalizado para todo território nacional, tanto na associação das drogas quanto na posologia, nos quais a dapsona é um dos componentes



obrigatórios, a avaliação destes perfis genéticos, dados ainda indisponíveis em nossa população, é de fundamental relevância para o controle da infecção.

Este estudo teve como principal objetivo fornecer informações sobre a variabilidade genética dos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *CYP3A4* e *CYP3A5* em coortes de pacientes de hanseníase residentes nas cinco diferentes macroregiões do Brasil. Paralelamente, avaliamos, em um estudo caso-controle, a associação dos diferentes polimorfismos identificados com as diferentes ADRs presentes nas populações de estudo para a possível implantação de núcleos de pesquisa inovadora em farmacovigilância. Acreditamos que tais dados serão úteis para a avaliação futura de novas drogas, modificação na conduta terapêutica ou correção da dosagem individual de dapsona (DDS) ora utilizada para o tratamento da hanseníase e outras dermatoses com base nos perfis genômicos envolvidos, predominantes nas diferentes regiões.



3. Objetivos

3.1- Objetivo Geral:

Este trabalho teve como objetivo principal a avaliação dos diferentes fenótipos de acetilação e hidroxilação nas diferentes macrorregiões do Brasil a partir da variabilidade genética dos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *CYP3A5**3, *6 e *CYP3A4**1B e a ocorrência de efeitos adversos em pacientes hansenianos em tratamento, com esquema contendo dapsona.

3.2- Objetivos Específicos:

- Determinar a frequência de SNPs no gene *NAT2* em amostras de DNA provenientes de indivíduos de cinco macro-regiões brasileiras;
- Determinar os haplótipos de *NAT2* mais frequentes e os perfis de acetilação presentes nas populações de estudo, comparando as frequências alélicas encontradas nos estados analisados;
- Identificar a frequência dos alelos 1A (-1053C) e 5 (-1053T) de *CYP2E1*, do alelo *1B de *CYP3A4*, dos alelos *3 e *6 de *CYP3A5* no grupo de estudo proveniente do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Acre, Rondônia, Tocantins, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Pernambuco, comparando as frequências alélicas encontradas nos estados analisados;
- Avaliar a associação entre fenótipo de acetilação lenta (presença de 2 alelos de *NAT2* que caracterizam baixa atividade) com reações adversas em pacientes hansenianos em tratamento com esquema contendo dapsona residentes no Rio de Janeiro, Espírito Santo, Acre, Tocantins, Rio Grande do Norte e Pernambuco;
- Avaliar a possível associação entre a ocorrência de reações adversas e a presença de polimorfismos nos genes que codificam para *CYP2E1*, *CYP3A4* e *CYP3A5* em pacientes hansenianos em tratamento, com esquema contendo dapsona residentes no Rio de Janeiro, Espírito Santo, Acre, Tocantins, Rio Grande do Norte e Pernambuco;
- Avaliar a possível associação entre a combinação dos fenótipos de acetilação lenta/hidroxiladores rápidos com reações adversas em pacientes hansenianos em tratamento com esquema contendo dapsona residentes nos estados analisados;
- Fornecer dados que possam subsidiar uma reavaliação na conduta terapêutica utilizada para doenças tratadas com drogas metabolizadas por algum dos genes estudados.



4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1- Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo que apresenta dois desenhos epidemiológicos: a) um estudo descritivo observacional com a finalidade de avaliar a prevalência dos SNPs presentes nos genes *NAT2*, *CYP2E1*, *CYP3A4* e *CYP3A5* e b) um estudo de associação do tipo caso-controle, envolvendo pacientes hansenianos sob tratamento com esquema terapêutico contendo dapsona e que tiveram reações adversas (casos) e pacientes hansenianos sob tratamento com mesmo esquema terapêutico e mesma posologia e que não tiveram reações adversas (controles).

4.2- Período de Estudo

O presente estudo teve uma duração de quatro anos.

4.3- Local de Estudo

4.3.1- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz - IOC/ Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias.

Após a coleta do material clínico realizada nas unidades abaixo relacionadas, estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias na Fiocruz, situado em Manguinhos, na cidade do Rio de Janeiro. Este laboratório foi o responsável por toda a execução da parte experimental que compreendeu o processamento das amostras (extração de DNA, amplificação da região de interesse dos genes especificados acima, purificação do fragmento amplificado, genotipagem dos genes de interesse, análise das sequências dos genes sequenciados), bem como tabulação e análise dos dados.

4.3.2- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz / IOC / Lab. de Genômica Funcional e Bioinformática.

Neste laboratório foi realizado o sequenciamento utilizando a Plataforma de Sequenciamento do PDTIS – Fiocruz.

4.3.3- Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz / IOC / Laboratório de Hanseníase / Ambulatório Souza Araújo

Situado no Campus da FIOCRUZ em Manguinhos na cidade do Rio de Janeiro. Trata-se de um ambulatório de referência para hanseníase, que atende a uma população referenciada de várias Unidades de saúde de várias partes do Rio de Janeiro (RJ) com cerca de 450-500



casos/ano notificados. Deste ambulatório foram recebidas 213 amostras, 88 casos e 125 controles (incluídos na tabela 4.1).

4.3.4- Demais Unidades de Saúde

LACEM – Rio Grande do Sul (RS); Hospital de Referência em Doenças Infecciosas Anuar Auad – Secretaria de Saúde do Estado de Goiás (GO); Secretarias dos Estados: Acre (AC), Rondônia (RO), Tocantins (TO), Espírito Santo (ES), Campos (RJ), Paraná (PR), Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN). O número (N) amostral e dados demográficos de cada município incluído no estudo estão descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1: N amostral e dados demográficos por município, estado e região

Estado/Região	N	Mulher	Homem	Idade
RO	70	32	38	18 - 71
AC	48	36	12	19 - 58
TO (Palmas + Gurupi)	72	51	21	22 - 61
REGIÃO NORTE	190	119	71	18 - 61
PE	52	SI	SI	18 - 65
RN	27	13	14	33 - 76
REGIÃO NORDESTE	79	SI	SI	18 - 76
GO	106	SI	SI	SI
REGIÃO CENTRO-OESTE	106	SI	SI	SI
RJ (RJ + Campos)	270	163	107	18 - 90
ES	69	44	25	20 - 87
REGIÃO SUDESTE	339	207	132	18 - 90
PR	10	4	6	30-57
RS	240	SI	SI	SI
REGIÃO SUL	250	SI	SI	SI
TOTAL	964	SI	SI	18 - 90

4.4- Critérios de elegibilidade

Foram considerados elegíveis para o estudo, de modo sistemático, pacientes de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos, com apresentação clínica variada, independente de cor que:

- Foram atendidos ambulatorialmente ou internados e receberam o diagnóstico de hanseníase, independente da forma clínica e que estejam ou tenham recebido tratamento poliquimioterápico específico padronizado e alternativo.



- b) Aceitaram participar do estudo, respondendo ao questionário (Anexos 1 e 2), e assinaram o termo de consentimento esclarecido (Anexo 3). Em seguida, foi procedida coleta do material biológico conforme descrição abaixo.

4.4.1- Critérios de inclusão

Portadores e/ou ex-portadores de hanseníase, maiores de 18 anos, de qualquer etnia ou gênero que estavam sendo submetidos ou tinham recebido alta dos esquemas poliquimioterápicos padronizados (controles) e os que estavam sendo submetidos ou tinham sido submetidos aos esquemas alternativos por terem apresentado efeitos colaterais diagnosticados clínica e/ou laboratorialmente atribuídos a dapsona (casos).

4.4.2- Critérios de exclusão

Foram excluídos os indivíduos:

- a) Pacientes de hanseníase infectados pelo vírus HIV;
- b) Pacientes menores de 18 anos;
- c) Pacientes que apresentaram problemas de alcoolismo ou com história pregressa de Hepatite viral B e C.

4.5- Coleta e processamento das amostras clínicas

De cada paciente arrolado no estudo, um volume de 1,5mL de sangue periférico foi coletado em tubo com *vaccuntainer* contendo EDTA ou tampão citrato com anticoagulante. Após homogeneização por inversão o mesmo foi congelado a -20°C para posterior extração do DNA.

4.6- Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado no comitê de ética do CEP-Fiocruz no dia 12 de agosto de 2008, com número 449/08.

4.7- Suporte Financeiro

- * FNS- Fundação Nacional de Saúde - 2010
- * POM – IOC - FIOCRUZ



4.8- Metodologia

4.8.1- Extração de DNA – Isolamento e purificação de DNA genômico a partir do Kit QIAamp (Qiagen)

A extração foi realizada a partir de 200µL de sangue periférico congelado através da utilização do *kit* comercial “QIAamp DNA blood[®]” (Qiagen), seguindo protocolo de acordo com o fabricante. Trata-se de um método comercial utilizado para extração de DNA de células do sangue periférico que consiste basicamente na adição de um tampão de lise seguido de precipitação dos núcleos das células e mitocôndrias por centrifugação e adição de um tampão de desnaturação o qual contém um sal caotrópico (Guanidina hidrocloreto) e protease passando por uma coluna de sílica. O DNA retido na membrana QIAamp é lavado duas vezes por centrifugação com a utilização de dois tampões de lavagem “Buffer AW1” e “Buffer AW2”. Esta etapa remove eficientemente os contaminantes tais como proteína e açúcares que podem inibir a PCR. A eluição do DNA se deu por centrifugação utilizando tampão com baixo sal: (10mM Tris-Cl pH 9,0; 0,5mM EDTA) e foi estocado a -20°C.

4.8.2- *N*-acetiltransferase 2 (*NAT2*).

Para a amplificação desse gene foram utilizadas as condições descritas por Teixeira *et al*, 2007. O desenho dos oligonucleotídeos (Tabela 4.2) utilizados para a amplificação do DNA, referente a um fragmento de aproximadamente 1093pb contendo a região codificante do gene *NAT2*, foi realizado com base na sequência referência (AY331807), do respectivo gene extraída do GenBank (Release 144) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) utilizando o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Tabela 4.2: Desenho dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de *NAT2*.

Iniciadores	Sequência 5'>3'
NAT2 Externo-Senso (ES)	TTA GTC ACA CGA GGA AAT CAA A
NAT2 Externo-Reverso (ER)	AAA TGC TGA CAT TTT TAT GGA TGA
NAT2 Interno-Senso (IS)	ACC ATT GAC GGC AGG AAT TA
NAT2 Interno-Reverso (IR)	TGG TCC AGG TAC CAG AT CC



4.8.2.1 Condições de amplificação da região codificante do gene *NAT2*.

A reação da PCR para amplificação de *NAT2* foi realizada utilizando os iniciadores NAT2-ES e NAT2-ER capazes de gerar um fragmento de 1093pb contendo a região codificante do referido gene (“*intronless*” 873 pb) em um volume total de 50µL contendo [3,5mM MgCl₂; 0,4mM dNTPs; Tampão 1X, glicerol 10%, 200ng de cada iniciador, *Taq Gold* DNA polimerase (applied Biosystem[®]) 1U, H₂O q.s.p 50µL] com aproximadamente 50ng de DNA genômico.

A condição de ciclagem para a amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 67°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto diminuindo 0,5°C a cada ciclo. Após esta ciclagem, foi adicionado mais 15 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e, por último, uma extensão final de 72°C durante 5 minutos.

4.8.2.2- Eletroforese em gel de agarose:

Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% [1/5 do produto em tampão “Loading buffer” 1X (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, glicerol 4%)] a 80V, em TAE 1X (Tris base 400 mM, EDTA 1mM, ácido acético 20 mM). Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz U.V. em transiluminador.

4.8.2.3- Purificação dos produtos da PCR para sequenciamento com *Kit ChargeSwitch[®] PCR Clean-Up* (Invitrogen).

Este sistema permite rápida e eficiente purificação dos produtos da PCR de sal, iniciadores, dNTPs e outros reagentes que não ácidos nucleicos. Depois da PCR, os produtos foram purificados rapidamente sem o uso de centrífugas ou solventes orgânicos. O ChargeSwitch é uma tecnologia baseada em esfera magnética que provê uma superfície de ligação que é dependente da carga e do pH do tampão circundante para facilitar a purificação do ácido nucleico. Em baixo pH, as esferas magnéticas têm uma carga positiva e liga o ácido nucleico carregado negativamente. Proteínas e outros contaminantes não se ligam e são descartados com o tampão de lavagem usado para lavagem das esferas. Para eluir o ácido nucleico, a carga na superfície é neutralizada por elevação do pH para 8,5 usando um tampão de eluição com baixo sal. O DNA purificado é eluído de acordo com recomendações do fabricante.



4.8.2.4- Sequenciamento automatizado.

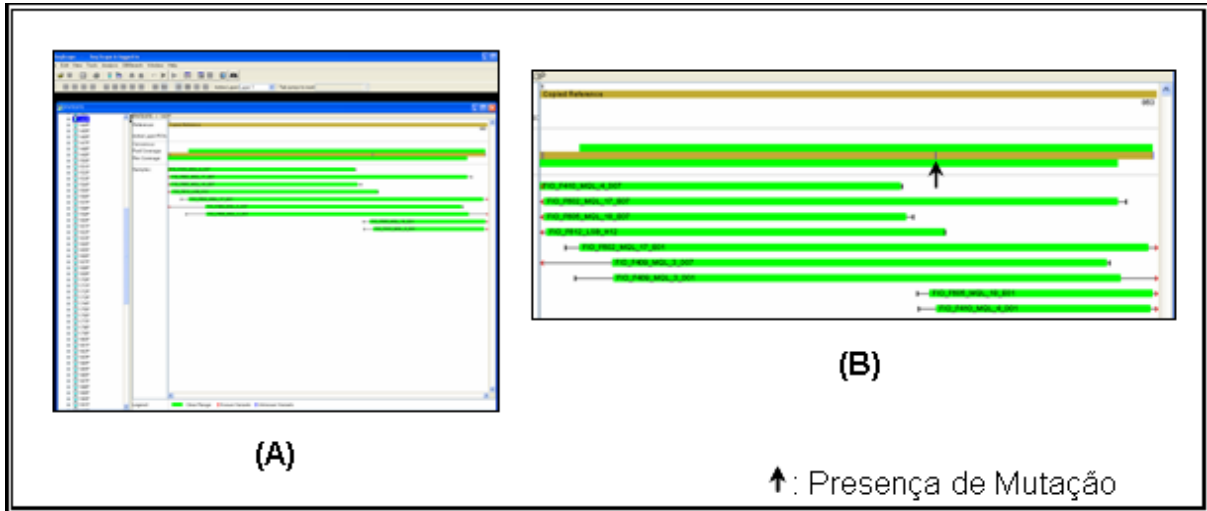
Tendo em vista o tamanho do produto amplificado a ser sequenciado, para o gene *NAT2*, foram utilizados dois iniciadores externos e dois iniciadores internos a fim de poder atingir de forma bem resolvida as extremidades.

A fim de identificar todos os possíveis SNPs encontrados na região codificante de *NAT2*, as reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o “kit ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1” (PE Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e adaptadas em nosso laboratório. Neste sistema a marcação fluorescente encontra-se na extremidade 3’ do nucleotídeo de terminação, com cada cor correspondendo à uma base específica. Sendo assim, é possível sequenciar uma amostra de DNA com uma única reação, contendo todos os terminadores juntos. Em cada reação de sequenciamento, utilizamos aproximadamente 20ng do produto amplificado e os iniciadores utilizados nas respectivas reações da PCR, como iniciadores externos e outros dois iniciadores internos desenhados apenas para o sequenciamento e com a finalidade de resolver bem o início da sequência pegando os iniciadores externos (Tabela 4.2). As reações foram analisadas no sequenciador de 96 capilares “ABI PRISM® 3730 XL DNA Analyzer” (Applied Biosystems), situado no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática da FIOCRUZ/ Plataforma PDTIS.

4.8.2.5- Análise das sequências e identificação dos SNPs presentes na região codificante do gene *NAT2*.

As sequências foram analisadas pelo programa SeqScape versão 2.6 da Applied Biosystems utilizando a sequência AY331807 da base de dados do PUBMED como referência (*NAT2**4, tipo selvagem). Este *software* é uma ferramenta de alinhamento e comparação de sequências que permite uma rápida identificação de variantes na sequência (Figura 4.1 A e B). O software permite alinhar e comparar sequências obtidas diretamente do sequenciador automático contra uma sequência referência (Figura 4.2). Ele é capaz de alinhar e comparar múltiplas amostras mostrando o eletroferograma e o índice de qualidade de cada sequência e o índice de qualidade do alinhamento e da comparação (Figura 4.3).

Além de identificar mutações pontuais na sequência, o programa SeqScape fornece o genótipo do referido polimorfismo, uma vez que estamos analisando os dois alelos através da estratégia escolhida: sequenciamento a partir de produto de PCR.



Figuras 4.1 A e B: Ilustração da utilização do Software v.2.5. Nesta janela podem ser observadas as sequências obtidas a partir de cada iniciador bem como a região de aproveitamento de cada uma delas (verde). Nesse indivíduo foi detectado 1 SNP, ou seja, 1 base se apresentou distinta da sequência referência (5B).

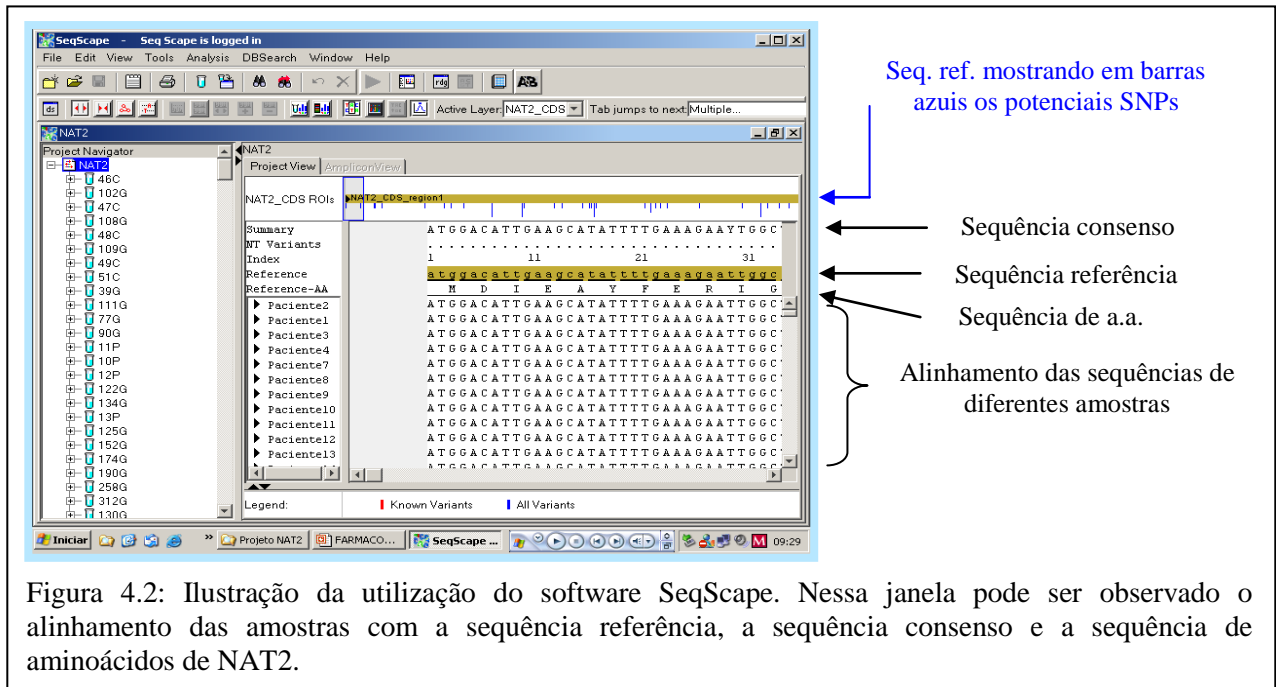
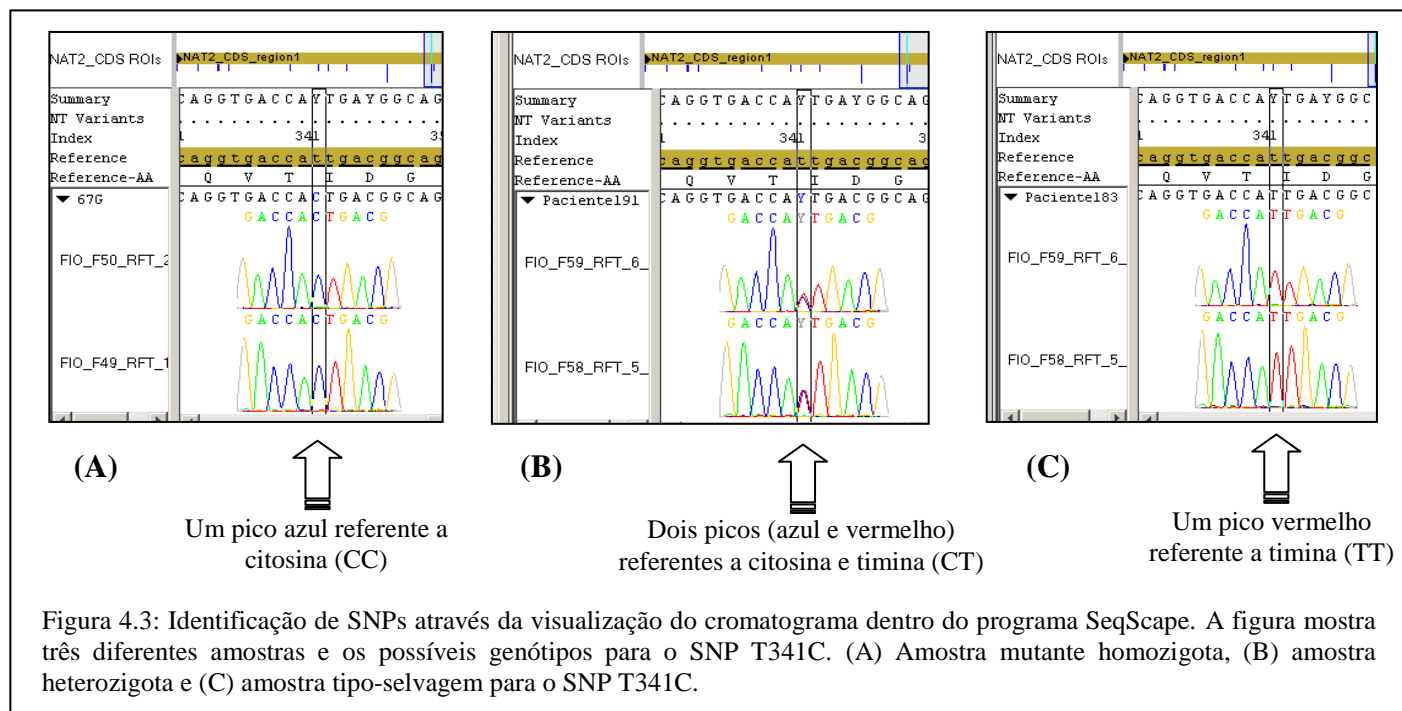


Figura 4.2: Ilustração da utilização do software SeqScape. Nessa janela pode ser observado o alinhamento das amostras com a sequência referência, a sequência consenso e a sequência de aminoácidos de NAT2.



4.8.2.6- Tabulação dos dados e caracterização dos haplótipos através do software

PHASE 2.1.1

Após a identificação dos SNPs, os dados foram tabulados e a reconstrução do haplótipo foi realizada através do programa PHASE v2.1.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003; Stephens & Sheet, 2005). Esta reconstrução é necessária para analisar simultaneamente os dois alelos (o paterno e o materno). Esta característica é um importante fator de incerteza no caso de uma análise *NAT2*, porque dois ou mais polimorfismos de inativação da enzima podem estar localizados em um alelo, deixando o outro alelo intacto, ou os polimorfismos podem ser distribuídos entre os dois alelos, que conduz a uma ausência de alelo *NAT2* funcional. A maioria dos resultados do método de genotipagem indica a soma de dois haplótipos (diplótipos) e em vez de indicar genótipos reais, muitos desses diplótipos podem representar diferentes genótipos com diferentes consequências funcionais. Assim, o algoritmo PHASE utiliza uma abordagem bayesiana para a reconstrução de haplótipos para obter genótipos não-ambíguos, o que determina o par de alelos mais provável (Agundez *et al.*, 2008).



4.8.2.7- Análise estatística

Todos os polimorfismos foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste do qui-quadrado (χ^2), considerando o valor de 5% ($p < 0,05$) como limiar de significância estatística entre os números observados e esperados separadamente em pacientes e controles.

A magnitude das associações foi estimada como razão de chances (Odds Ratio, OR) com seus respectivos intervalos de confiança. O nível de significância adotado para o estudo de associação também foi de 5%. O programa SPSS foi utilizado para todas as análises.

4.8.3- *CYP3A4*1B*

A genotipagem deste gene foi realizada utilizando uma adaptação do método desenvolvido por Cavalli e colaboradores, 2001, para detecção da variante na posição -290 (A→G) na região promotora (5'PR) do gene *CYP3A4*. A amplificação da região de interesse por PCR (-318 a +67) foi realizada utilizando os mesmos iniciadores (Tabela 4.3) descrito neste método em um volume de reação de 25µL contendo [12,5µL de Kapa *master mix* (KAPA2G fast HotStart ReadyMix) e 0,2µM de cada primer] e 50ng de DNA.

A condição de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 4 segundos e, por último, uma extensão final de 72°C durante 5 minutos.

A detecção da mutação foi feita por sequenciamento direto do produto da PCR (385pb), após purificação dos mesmos com o *kit* Charge Switch® PCR Clean-Up (Invitrogen) conforme descrito anteriormente para *NAT2*. A análise da sequência obtida foi feita utilizando o programa SeqScape v2.6 como descrito para *NAT2*. A sequência referência utilizada para a análise foi a mesma utilizada por Cavalli para o desenho dos iniciadores publicada no GenBank, D11131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

Tabela 4.3: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de *CYP3A4*1B*.

Iniciadores <i>CYP3A4*1B</i>	Sequências 5' – 3'
Senso	GGA ATG AGG ACA GCC ATA GAG ACA AGG GGA
Reverso	CCT TTC AGC TCT GTG TTG CTC TTT GCT G

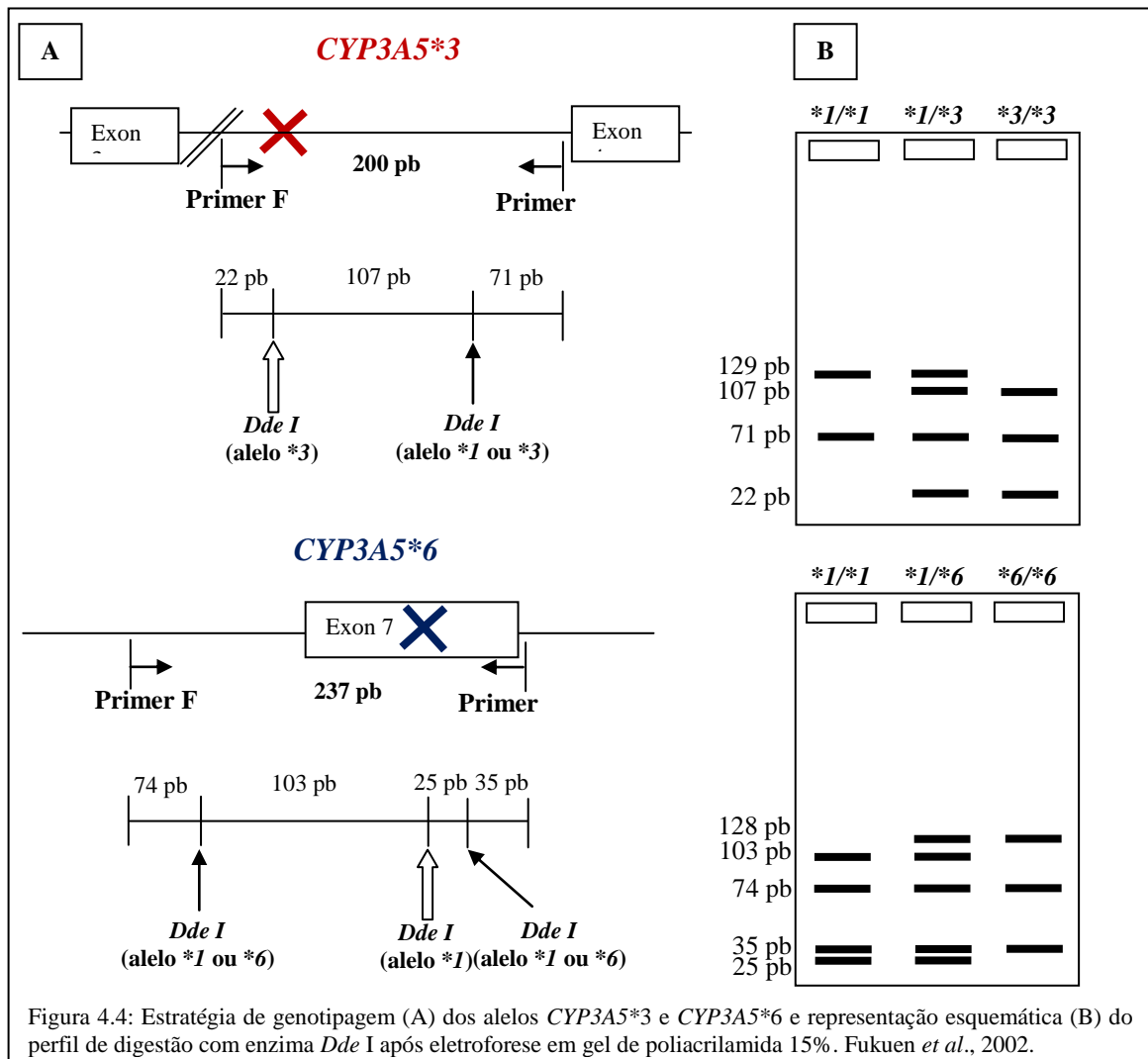
4.8.4- *CYP3A5*

Para a genotipagem dos alelos *CYP3A5*3* e **6* e a identificação dos três genótipos (1A/1A; 1A/3 e 3/3) e (1A/1A; 1A/6 e 6/6) utilizamos a técnica PCR-RFLP descrita por



Fukuen e colaboradores (2002) a qual consistiu na amplificação de uma região de interesse (200 pb) e (237 pb) respectivamente, flanqueando o SNP, onde é criado um erro na sequência do DNA amplificado. Desta maneira, as amostras que apresentarem o alelo mutante, criam ou destroem o sítio de restrição para a enzima *Dde I*.

O alelo *3 (A₆₉₈₆G) muda a sequência CTCAA criando um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *DdeI* CTCAG (Figura 4.4). O alelo *6 (G₁₄₆₉₀A) muda a sequência CTAAG destruindo um sítio de reconhecimento para a enzima *DdeI* CTAAA (Figura 4.4).



4.8.4.1- Condições de amplificação do gene *CYP3A5**3

Para a amplificação desta variante foram feitas algumas modificações do método descrito por Fukuen e colaboradores (2002), o que resultou em melhor amplificação, tal como a concentração dos iniciadores e a enzima *Taq* polimerase. A reação foi realizada em um volume de 25µL contendo [12,5µL de Kapa máster mix e 0,2µM de cada primer (Tabela 4.4)].



A condição de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 57°C por 15 segundos, 72°C por 4 segundos e, por último, uma extensão final de 72°C durante 3 minutos.

Tabela 4.4: Iniciadores utilizados para amplificação da variante alélica *CYP3A5*3*.

<i>CYP3A5*3</i>	Sequência 5'→3'
Senso (<i>CYP3A5*3F</i>)	CTT TAA AGA GCT CTT TTG TCT CTC
Reverso (<i>CYP3A5*3R</i>)	CCA GGA AGC CAG ACT TTG AT

4.8.4.2- Condição da digestão *CYP3A5*3* amplificado com *DdeI*.

Após a amplificação, a genotipagem do alelo *CYP3A5*3* foi realizada através da digestão enzimática (RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*) do material amplificado conforme descrito por Fukuen e colaboradores (2002). Resumidamente, 7 µL do produto amplificado foi digerido com 5U da enzima *DdeI*, o tubo contendo a reação de digestão foi incubado por 2 horas a 37°C. Após este tempo a reação foi interrompida pela adição do tampão (*Loading Buffer 5X*), contendo azul de bromofenol, xilenocianol e glicerol. O produto da digestão foi aplicado em gel de poliacrilamida 15% para identificação dos genótipos.

4.8.4.3- Condições de amplificação do gene *CYP3A5*6*.

Para a amplificação desta variante também foram feitas algumas modificações do método descrito por Fukuen e colaboradores (2002) mudando a concentração dos iniciadores e a enzima *Taq* polimerase, também resultando em melhor amplificação e conseqüentemente maior concentração do produto amplificado com menor tempo de reação. Como para o alelo 3, a reação foi realizada em um volume de 25µL contendo [12,5µL de Kappa máster mix e 0,2µM de cada primer (Tabela 4.5)].

A condição de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 58°C por 15 segundos, 72°C por 4 segundos e, por último, uma extensão final de 72°C durante 3 minutos.

Tabela 4.5: Iniciadores utilizados para amplificação da variante alélica *CYP3A5*6*.

<i>CYP3A5*6</i>	Sequência 5'→3'
Senso (<i>CYP3A5*6F</i>)	CTG GGT TTC TTG CTG CAT GT
Reverso (<i>CYP3A5*6R</i>)	GCC CAC ATA CTT ATT GAG AG



4.8.4.4- Condição da digestão *CYP3A5*6* amplificado com *DdeI*.

Após a amplificação, a genotipagem do alelo *CYP3A5*6* foi realizada através da digestão enzimática (RFLP) do material amplificado conforme descrito por Fukuen e colaboradores, 2002. Como o alelo 3, foi utilizado 7 µL do produto amplificado para a digestão com 5U da enzima *DdeI*. O tubo contendo a reação de digestão foi incubado por 2 horas a 37°C. Após este tempo a reação foi interrompida pela adição do tampão (*Loading Buffer 5X*), contendo azul de bromofenol, xilenocianol e glicerol. O produto da digestão foi aplicado em gel de poliacrilamida 15% para identificação dos genótipos.

4.8.5- *CYP2E1*

Para a genotipagem do SNP -1053 C→T e a identificação dos três genótipos de *CYP2E1* (1A/1A; 1A/5; 5/5) utilizamos a técnica de PCR-RFLP, a qual consistiu na amplificação de uma região de interesse (413 pb), flanqueando o SNP, e na posterior digestão do produto amplificado com a enzima de restrição *Rsa I* (Huang *et al.*, 2003). A amplificação foi realizada em um volume de reação de 50µL contendo (MgCl₂ 3mM, dNTPs 0,2mM, glicerol 5%, 200ng de cada primer (Tabela 4.6), 1U de *Taq* polimerase (Invitrogen®) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos de 94°C 1min, 57°C 30 segundos, 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 5 minutos.

Após a amplificação, a genotipagem do gene *CYP2E1* foi realizada através da digestão enzimática (RFLP) do material amplificado conforme descrito por Huang e colaboradores, 2002. Resumidamente 7 µL do produto amplificado foi digerido com 5U da enzima *Rsa I*, o tubo contendo a reação de digestão foi incubado por 2 horas ou até 16 horas a 37°C. Após este tempo a reação foi interrompida pela adição do tampão (*Loading Buffer 5X*), contendo azul de bromofenol, xilenocianol e glicerol. O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 2% para identificação dos genótipos.

Tabela 4.6: Iniciadores utilizados para amplificação de parte da região promotora de *CYP2E1*.

Iniciador	Sequência 5'→3'
CYP2E1F	5' CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA 3'
CYP2E1R	5' TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG 3'



5. Resultados

5.1 – Pacientes – Características sócio-demográficas e clínicas

O estudo foi realizado em amostras de pacientes hansenianos abrangendo todo o espectro clínico da doença, agrupados para fins de tratamento em multibacilares e paucibacilares, provenientes das cinco diferentes macrorregiões do Brasil.

Para o estudo exclusivamente descritivo foram incluídos 964 amostras de dez estados para a avaliação de *NAT2* e oito estados para os genes da superfamília CYP450 avaliados neste estudo (com N variando para cada gene) (Tabela 5.1). Os dados da genotipagem do gene *NAT2* nas amostras de RS e GO foram obtidos a partir de colaboração com outros grupos de pesquisa. Assim a indisponibilidade destas amostras em nosso laboratório, inviabilizou a análise das mesmas para CYP450.

Para o estudo do tipo caso controle, foram incluídos somente sete estados devido à falta de informações clínicas que permitissem a estratificação dos pacientes nos diferentes subgrupos a serem avaliados. Para este modelo de estudo, utilizamos pacientes operacionalmente classificados como multibacilares (n=282) e paucibacilares (n=166). Contudo, esta informação não estava disponível para todos os pacientes (n=103). O desfecho avaliado foi a ocorrência de ADRs e os diferentes tipos de ADRs identificados encontram-se descritos na tabela 5.2, onde podemos observar uma predominância de reações hematológicas em comparação com os outros grupos. Dentre estas, a anemia hemolítica merece destaque devido a alta prevalência e variação em sua frequência nos diferentes estados (Figura 5.1), seguida da síndrome da dapsona.

Tabela 5.1: Distribuição e descrição demográfica dos pacientes entre os estados e regiões para cada gene. SI = sem informação.

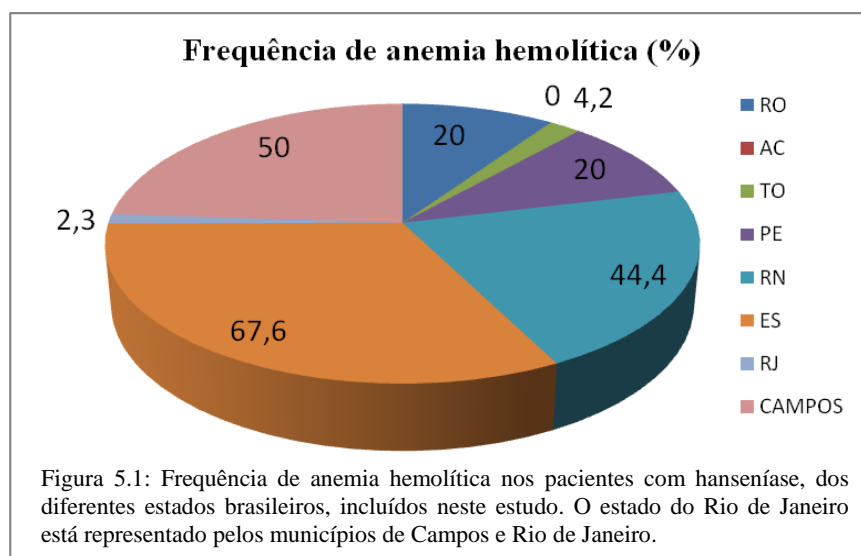
Estado/Região	N	Mulher	Homem	Idade	<i>NAT2</i>	<i>CYP2E1</i>	<i>CYP3A5*3</i>	<i>CYP3A5*6</i>	<i>CYP3A4*1B</i>
RO	70	32	38	18 - 71	70	66	64	65	64
AC	48	36	12	19 - 58	48	48	48	48	48
TO (Palmas + Gurupi)	72	51	21	22 - 61	72	72	72	72	71
REGIÃO NORTE	190	119	71	18 - 61	190	186	184	185	183
PE	52	SI	SI	18 - 65	52	21	21	21	21
RN	27	13	14	33 - 76	27	27	27	27	26
REGIÃO NORDESTE	79	SI	SI	18 - 76	79	48	48	48	47
GO	106	SI	SI	SI	106	0	0	0	0
REGIÃO CENTRO-OESTE	106	SI	SI	SI	106	0	0	0	0



RJ (RJ + Campos)	270	163	107	18 - 90	270	266	266	268	255
ES	69	44	25	20 - 87	69	69	69	69	67
REGIÃO SUDESTE	339	207	132	18 - 90	339	335	335	337	322
PR	10	4	6	30-57	10	10	10	10	10
RS	240	SI	SI	SI	240	0	0	0	0
REGIÃO SUL	250	SI	SI	SI	250	10	10	10	10
TOTAL	964	SI	SI	18 - 90	964	579	577	580	562

Tabela 5.2: Descrição dos diferentes tipos de ADRs identificados neste estudo.

Tipos de ADRs	N	%
Hematológicas	119	54,83
Anemia	55	25,34
Anemia hemolítica	42	19,35
metemoglobinemia	22	10,13
Hepáticas	26	12,8
Hepatotoxicidade	13	5,99
Hepatite medicamentosa	10	4,60
Icterícia	3	1,38
Cutâneas	19	9,36
Rash cutâneo / erupção cutânea	14	6,45
Síndrome Estevem Johson	1	0,46
Exantema eritematoso	4	1,84
Síndrome da dapsona	16	7,39
Pelo menos duas combinações	19	8,75
Neural	3	1,38
Outras	12	5,52
	217	100



5.2 – Estudo descritivo:

A genotipagem dos alvos avaliados neste estudo foi realizada utilizando diferentes metodologias que permitiram, além da identificação dos polimorfismos presentes, a determinação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas. Com base na análise destes dados, foi possível inferir os fenótipos de acetilação / hidroxilação e obter o panorama de sua distribuição geográfica no território brasileiro.

5.2.1- Extração de DNA genômico a partir de sangue total:

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas amostras de DNA isoladas a partir de alíquotas de 200 μ L de sangue periférico, através da utilização de *kit* comercial. O rendimento e a qualidade do DNA isolado foram satisfatórios em todas as amostras, como mostra a figura 5.2.

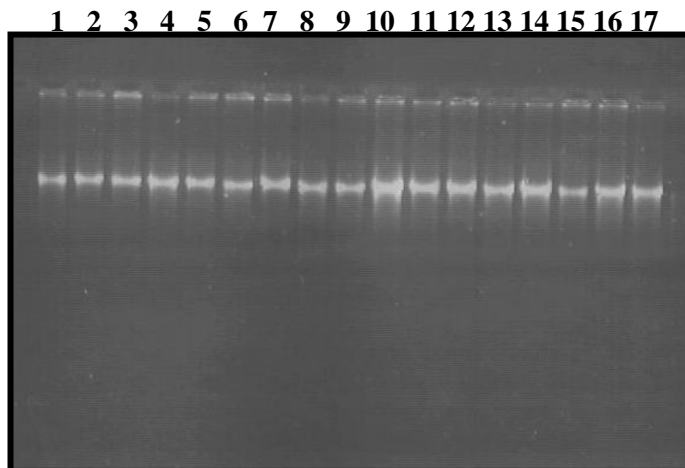


Figura 5.2: Gel de agarose 1% mostrando amostras de DNA humano.
Linhas: 1-17 DNA proveniente de 17 amostras de pacientes.

5.2.2 – Genotipagem e análise do perfil genético de *NAT2*

A genotipagem do gene *NAT2* foi realizada em 964 amostras provenientes de dez estados do Brasil: RJ, ES, AC, RO, TO, RN, PE, GO, PR e RS, através da amplificação e sequenciamento da região codificante (Teixeira *et al.*, 2007).

As quatro sequências obtidas de cada amostra foram analisadas para a identificação de SNPs através de alinhamento com a sequência referência utilizando o software SeqScape v.2.5 (Applied Biosystems), conforme descrito na metodologia. Todas as amostras apresentaram sequências com tamanho variando de 500 a 800 pb com ótima qualidade (“Phred quality” $Q \geq 20$). A análise das sequências geradas permitiu a identificação dos SNPs presentes, dos alelos, dos genótipos e determinação dos perfis de acetilação predominantes.



Foram identificados 23 SNPs na amostragem estudada, todos já descritos na literatura. As frequências alélicas para mutação foram calculadas por estado e estão representadas na tabela 5.3. Os sete SNPs mais frequentes encontrados na população mundial e também na nossa população estão representados por estado na figura 5.3.

Frequências dos sete principais SNPs entre os estados analisados

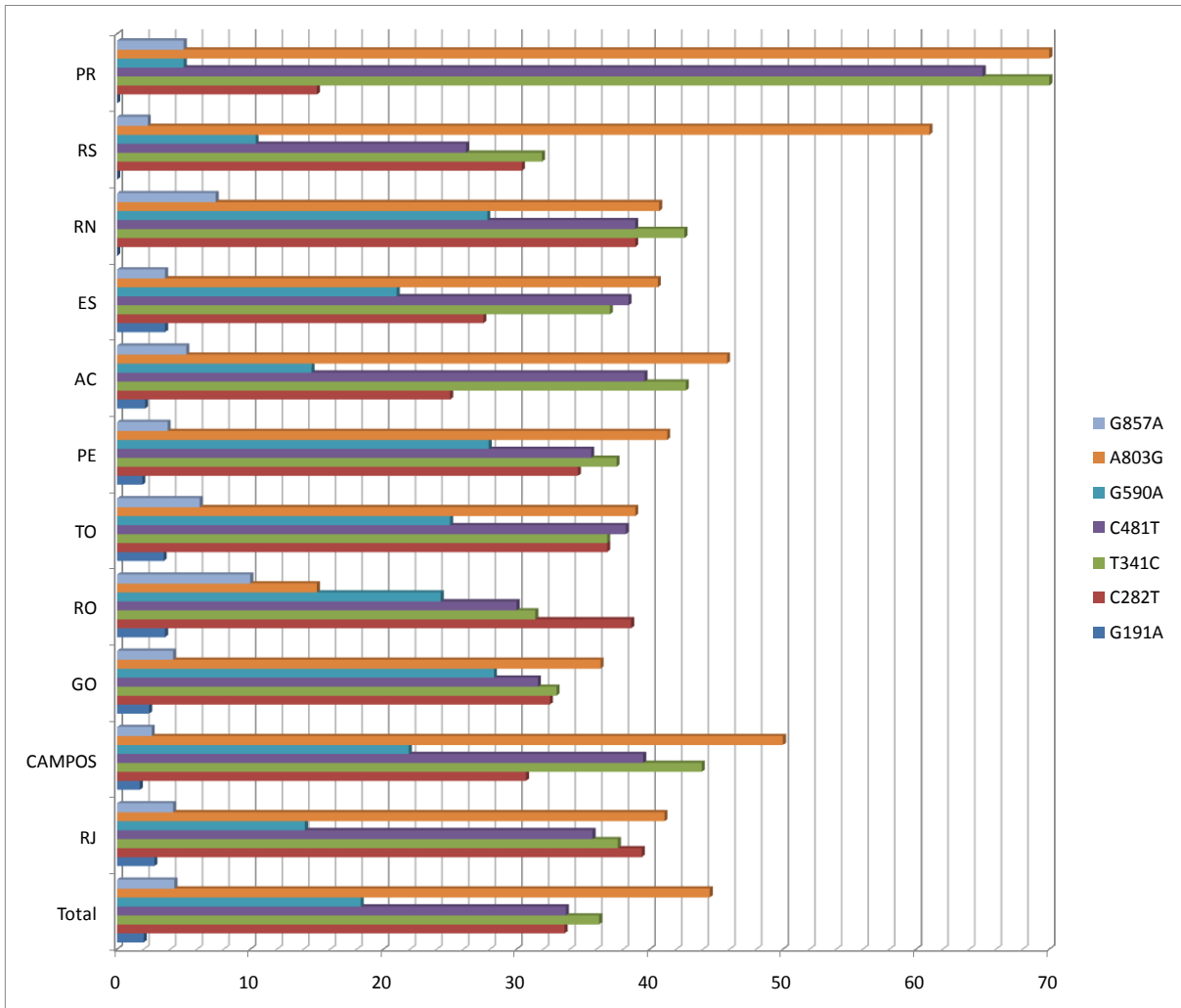


Figura 5.3: Distribuição das frequências dos sete principais SNPs de NAT2 nos estados analisados.

Tabela 5.3: Frequência alélica dos SNPs da região codificante de *NAT2* encontrados na população de estudo.

SNP	TOTAL	RJ	GO	RO	TO	PE	AC	ES	RN	RS	PR
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
33 C>A	16 (0,80)	11 (2,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,70)	3 (2,90)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (5,00)
77 A>C	1 (0,05)	1 (0,20)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
82 C>T	1 (0,05)	1 (0,20)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (15,00)
191 G>A	38 (2,00)	14 (2,60)	5 (2,40)	5 (3,60)	5 (3,50)	2 (1,90)	2 (2,10)	5 (3,60)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
195 T>G	5 (0,30)	4 (0,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
255 G>A	2 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
282 C>T	647 (33,60)	203 (37,60)	69 (32,50)	54 (38,60)	53 (36,80)	36 (34,60)	24 (25,00)	38 (27,50)	21 (38,90)	146 (30,40)	3 (15,00)
341 T>C	698 (36,20)	210 (38,90)	70 (33,00)	44 (31,40)	53 (36,80)	39 (37,50)	41 (42,70)	51 (37,00)	23 (42,60)	153 (31,90)	14 (70,00)
345 C>T	2 (0,10)	0 (0,00)	2 (0,90)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
403 C>G	8 (0,40)	4 (0,70)	1 (0,50)	0 (0,00)	1 (0,70)	1 (1,00)	0 (0,00)	1 (0,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
472 A>C	4 (0,20)	0 (0,00)	2 (0,90)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,00)	1 (0,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
481 C>T	649 (33,70)	197 (36,50)	67 (31,60)	42 (30,00)	55 (38,20)	37 (35,60)	38 (39,60)	53 (38,40)	21 (38,90)	126 (26,20)	13 (65,00)
518 A>G	1 (0,05)	1 (0,20)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
578 C>T	5 (0,30)	3 (0,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (5,00)
590 G>A	353 (18,30)	85 (15,70)	60 (28,30)	34 (24,30)	36 (25,00)	29 (27,90)	14 (14,60)	29 (21,00)	15 (27,80)	50 (10,40)	1 (5,00)
600 A>G	1 (0,05)	0 (0,00)	1 (0,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
609 G>T	4 (0,20)	2 (0,40)	1 (0,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
622 T>C	1 (0,05)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
683 C>T	1 (0,05)	1 (0,20)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
766 A>G	5 (0,30)	0 (0,00)	2 (0,90)	1 (0,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
803 A>G	858 (44,50)	232 (43,00)	77 (36,30)	21 (15,00)	56 (38,90)	43 (41,30)	44 (45,80)	56 (40,60)	22 (40,70)	293 (61,00)	14 (70,00)
838 G>A	8 (0,40)	5 (0,90)	0 (0,00)	1 (0,70)	2 (1,40)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
857 G>A	83 (4,30)	21 (3,90)	9 (4,20)	14 (10,00)	9 (6,20)	4 (3,80)	5 (5,20)	5 (3,60)	4 (7,40)	11 (2,30)	1 (5,00)
Total (alelos)	1928	540	212	140	144	104	96	138	54	480	20



Com base nos dados obtidos após a genotipagem, utilizando o software PHASE 2.1, identificamos 45 haplótipos de alta resolução na população de estudo, calculamos suas respectivas frequências e, posteriormente caracterizamos os diferentes alelos associados aos diferentes perfis de acetilação considerando apenas os alelos com frequência acima de 1%, 21 no total, mostrados na tabela 5.4. Determinamos os genótipos obtidos para cada grupo do estudo e calculamos as frequências genotípicas (Tabela 5.5-Anexo 4).

Finalizada esta etapa, concluímos então, um de nossos principais objetivos, que foi obter as frequências dos diferentes perfis fenotípicos de acetilação com base na variabilidade genética de *NAT2* em cinco diferentes macrorregiões do Brasil (Tabela 5.6).



Tabela 5.4: Frequência dos principais haplótipos de *NAT2* encontrados com frequência acima de 1% em pelo menos um estado. ND = fenótipo não determinado.

ALELO	FENÓTIPO	Total N (%)	RJ N (%)	Campos RJ N (%)	ES N (%)	RO N (%)	TO N (%)	PE N (%)	AC N (%)	RN N (%)	PR N (%)	RS N (%)	GO N (%)
<i>NAT2*5B</i>	Lento	509 (26,40)	146 (34,27)	41 (35,96)	45 (32,61)	16 (11,43)	52 (36,11)	32 (30,77)	36 (37,50)	19 (35,19)	11 (55,00)	109 (22,71)	62 (29,25)
<i>NAT2*4</i>	Rápido	323 (16,75)	82 (19,25)	18 (15,79)	40 (28,99)	33 (23,57)	34 (23,61)	22 (21,15)	26 (27,08)	9 (16,67)	3 (15,00)	0 (0,00)	58 (27,36)
<i>NAT2*6^a</i>	Lento	275 (14,26)	56 (13,15)	22 (19,30)	29 (21,01)	31 (22,14)	34 (23,61)	27 (25,96)	12 (12,50)	15 (27,78)	1 (5,00)	48 (10,00)	56 (26,42)
<i>NAT2*12A</i>	Rápido	134 (6,95)	12 (2,82)	9 (7,89)	1 (0,72)	1 (0,71)	0 (0,00)	3 (2,88)	4 (4,17)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (2,82)
<i>NAT2*13A</i>	Rápido	131 (6,79)	68 (15,96)	5 (4,39)	1 (0,72)	1 (0,71)	1 (0,69)	1 (0,96)	1 (1,04)	0 (0,00)	0 (0,00)	44 (9,17)	1 (0,47)
<i>NAT2*7B</i>	Lento	68 (3,53)	18 (4,23)	3 (2,63)	0 (0,00)	13 (9,29)	9 (6,25)	4 (3,85)	6 (6,25)	4 (7,41)	0 (0,00)	6 (1,25)	9 (4,25)
<i>NAT2*5C</i>	Lento	51 (2,65)	8 (1,88)	4 (3,51)	3 (2,17)	3 (2,14)	0 (0,00)	2 (1,92)	3 (3,13)	3 (5,56)	1 (5,00)	24 (5,00)	3 (1,42)
<i>NAT2*12B</i>	Rápido	44 (2,28)	1 (0,23)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,69)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	42 (8,75)	0 (0,00)
<i>NAT2*5A</i>	Lento	39 (2,02)	4 (0,94)	2 (1,75)	1 (0,72)	22 (15,71)	1 (0,69)	2 (1,92)	1 (1,04)	1 (1,85)	0 (0,00)	5 (1,04)	1 (0,47)
<i>NAT2*14B</i>	Lento	27 (1,40)	11 (2,58)	2 (1,75)	3 (2,17)	2 (1,43)	5 (3,47)	2 (1,92)	2 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,94)
<i>NAT2*5D</i>	Lento	16 (0,83)	0 (0,00)	1 (0,88)	0 (0,00)	3 (2,14)	0 (0,00)	1 (0,96)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11 (2,29)	0 (0,00)
<i>NAT2*12C</i>	Rápido	14 (0,73)	0 (0,00)	8 (7,02)	3 (2,17)	1 (0,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>NAT2*14A</i>	Lento	8 (0,41)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,45)	3 (2,14)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (1,42)
<i>NAT2*6O</i>	ND	7 (0,36)	2 (0,47)	2 (1,75)	0 (0,00)	1 (0,71)	2 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>NAT2*6H</i>	ND	6 (0,31)	1 (0,23)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,94)
<i>NAT2*New14*</i>	ND	6 (0,31)	1 (0,23)	2 (1,75)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (5,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>NAT2*11A</i>	Rápido	4 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,72)	2 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,85)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>NAT2*7A</i>	Lento	3 (0,16)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,71)	0 (0,00)	1 (0,96)	1 (1,04)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>NAT2*5N</i>	ND	3 (0,16)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,04)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,94)
<i>NAT2*6F</i>	ND	2 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,96)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>NAT2*22</i>	ND	1 (0,05)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,04)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Total		1928	426	114	138	140	144	104	96	54	20	480	212

* Alelo novo, identificado após reconstrução haplotípica, contendo as seguintes mutações: 33 C>A, 341 T>C; 481 C>T, 803 A>G.

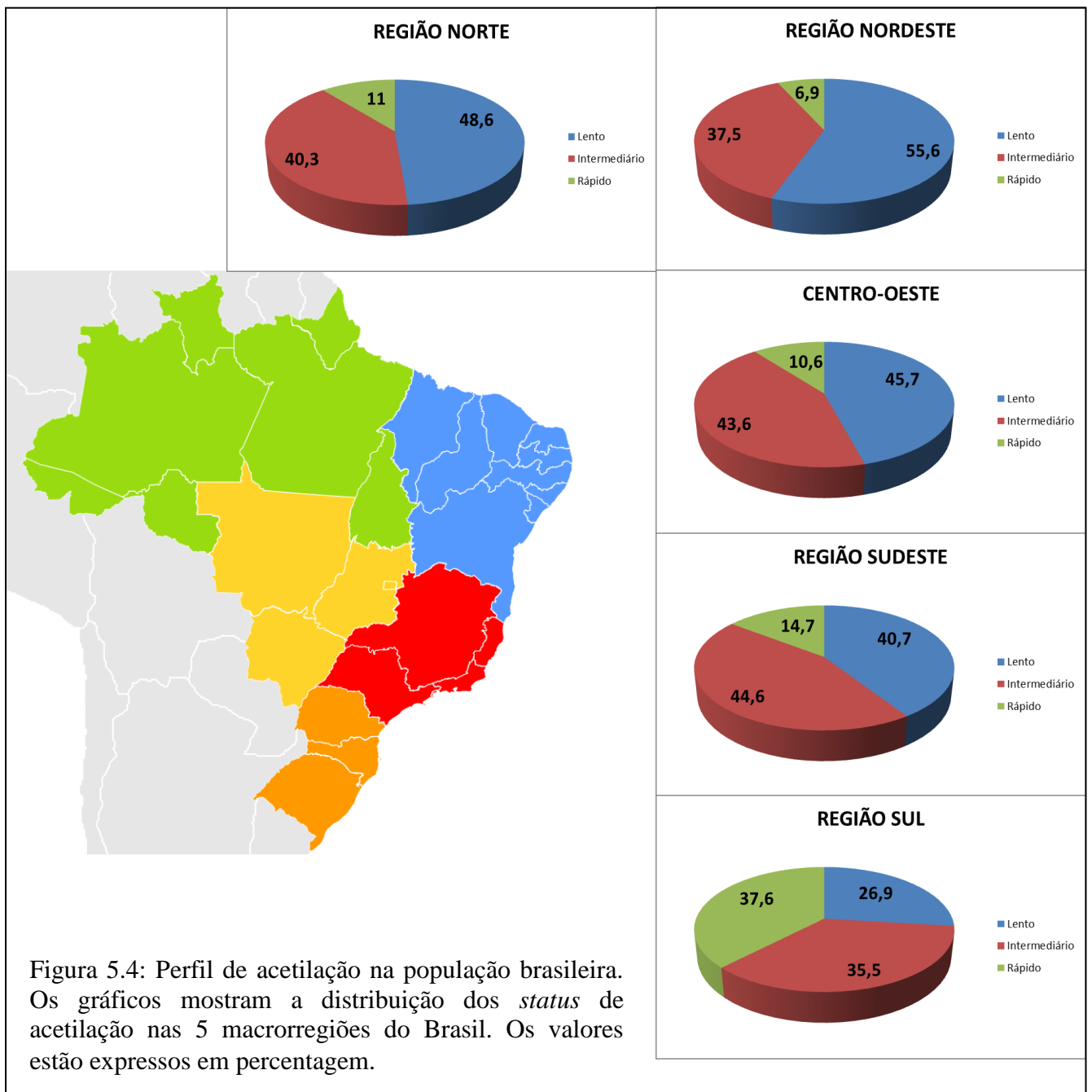


Entretanto, foi possível inferir o fenótipo de acetilação de apenas 904 indivíduos, uma vez que, após a genotipagem e caracterização haplotípica, 60 indivíduos apresentaram alelos novos, ainda sem estudos funcionais capazes de prever o fenótipo de acetilação, sendo portanto classificados como não determinados (ND).

Segundo os resultados, o perfil de acetilação intermediária foi o predominante no Brasil (45,3 %), seguido de acetiladores lentos (44,9 %) e acetiladores rápidos (21,4 %). Contudo, como podemos observar na tabela 5.6 e figura 5.4, os perfis variaram dependendo da região estudada.

Tabela 5.6: Frequências dos diferentes perfis fenotípicos de acetilação em cinco diferentes macrorregiões do Brasil.

NAT2	Lento	Intermediário	Rápido	
Estado/Região	N (%)	N (%)	N (%)	Total
RO	31 (46,4)	29 ^(43,3)	7 (10,4)	67
AC	20 (44,4)	19 (42,2)	6 (13,3)	45
TO (Gurupi+Palmas)	37 (53,6)	25 (36,2)	7 (10,1)	69
REGIÃO NORTE	88 (48,6)	73 (40,3)	20 (11,0)	181
PE	24 (53,3)	17 (37,8)	4 (8,9)	45
RN	16 (59,3)	10 (37,0)	1 (3,7)	45
REGIÃO NORDESTE	40 (55,6)	27 (37,5)	5 (6,9)	72
GO	43 (45,7)	41 (43,6)	10 (10,6)	94
CENTRO-OESTE	43 (45,7)	41 (43,6)	10 (10,6)	94
RJ (RJ+Campos)	96 (39,18)	113 (46,12)	36 (14,69)	245
ES	31 (46,3)	26 (38,8)	10 (14,9)	67
REGIÃO SUDESTE	127 (40,7)	139 (44,6)	46 (14,7)	312
PR	6 (60,0)	3 (30,0)	1 (10,0)	10
RS	60 (25,5)	84 (35,7)	91 (38,7)	235
REGIÃO SUL	66 (26,9)	87 (35,5)	92 (37,6)	245
BRASIL	364 (44,9)	367 (45,3)	173 (21,4)	904



As diferenças entre os perfis de acetilação observados nas diferentes macrorregiões estudadas foram avaliadas a partir da comparação baseada em um teste de homogeneidade indicada pelo valor do χ^2 . O resultado deste teste permitiu o agrupamento ou não, dependendo da homogeneidade ou não, das diferentes amostras.

A comparação entre todos os municípios, estados e regiões apresentou diferença significativa ($\chi^2 = 98,86$; p -valor $< 0,0001$), mostrando que os mesmos não eram homogêneos entre si. A fim de identificar quais estados ou regiões estavam influenciando as diferenças em relação aos fenótipos de acetilação, procedemos a



partição do χ^2 através da comparação dos grupos dois a dois. Todas as amostras cujo resultado do χ^2 não eram significativos foram agrupadas.

Não houve diferença significativa entre os estados das regiões Norte/Nordeste, significando que as mesmas eram homogêneas, podendo portanto ser agrupadas. A região Sudeste apresentou diferença significante em comparação com as regiões Norte e Nordeste ($\chi^2 = 6,459$ e p -valor = 0,0396), mas não em relação a região Centro-Oeste.

Os estados da região Sudeste não apresentaram diferença significativa entre si, assim como os estados da região Sul.

A região Sul apresentou diferença significativa de todas as regiões: Sul / Sudeste ($\chi^2 = 42,32$ p valor < 0,0001); Sul / Norte e Nordeste ($\chi^2 = 64,00$ e p valor < 0,0001) e Sul / Centro-Oeste ($\chi^2 = 22,14$ e p valor < 0,0001) com um predomínio de acetiladores rápidos. Com base nestes resultados, repetimos o teste de homogeneidade anterior, com todos os estados e municípios somente levando em consideração o perfil de acetiladores rápidos. Os resultados mostraram uma heterogeneidade geral entre os estados analisados ($\chi^2 = 83,36$ (p valor < 0,0001). A exemplo do procedimento anterior, foi realizada a partição do χ^2 e única diferença significante foi a frequência de acetiladores rápidos no estado do Rio Grande do Sul em relação aos demais. Este dado permitiu o agrupamento de todos os estados do Norte, Nordeste e Sudeste, em relação aos acetiladores rápidos. A comparação deste grupo com a região Sul apresentou uma diferença altamente significativa ($\chi^2 = 78,10$ e p valor < 0,0001).

5.3- Inclusão de outros genes envolvidos no metabolismo da dapsona

Embora este projeto tivesse como único alvo de estudo o gene *NAT2*, no decorrer do mesmo, ao estabelecer a via de metabolização da dapsona no organismo verificamos o envolvimento de outros genes, basicamente da superfamília do citocromo P-450. Tendo em vista a importância dos mesmos na formação de metabólitos tóxicos quando da biotransformação desta droga e a presença de polimorfismos já descritos na literatura e com papel funcional definidos, resolvemos incluir os mesmos em nosso estudo de modo a facilitar o entendimento sobre a influência do *background* genético na ocorrência de reações adversas induzidas pela dapsona. Neste contexto, procedemos a genotipagem de alguns polimorfismos de importância funcional já descritos nos genes *CYP2E1* - SNP -1053 C→T, *CYP3A5*3* SNP A→G no intron 3 e SNP G→A *CYP3A5*6* (exon 7) e *CYP3A4*1B*, SNP -290 A→G em 579 amostras provenientes dos seguintes estados: RO, AC, TO, PE, RN, RJ, ES e PR.



5.3.1- *CYP2E1*

Para a genotipagem e a identificação dos três genótipos referentes ao SNP -1053 C→T utilizamos a técnica de PCR-RFLP conforme a figura 5.5. As frequências alélicas e genóticas deste polimorfismo foram calculadas com base na genotipagem de 579 amostras provenientes dos estados: RO, AC, TO, PE, RN, RJ, ES e PR.

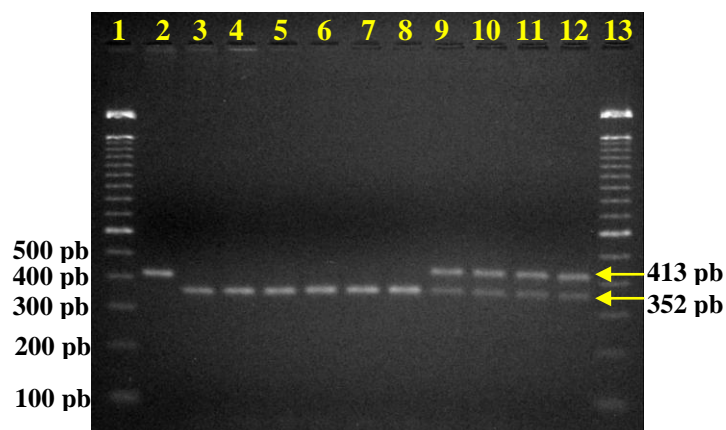


Figura 5.5 Gel de agarose 2%. Perfil de digestão (*Rsa* I) dos três genótipos de *CYP2E1* para o SNP -1053 C→T. Poços (1 e 13) Marcador de peso molecular de 100 pb; (2) genótipo mutante homozigoto (5/5); (3 a 8) genótipo tipo-selvagem homozigoto (1A/1A); (9 a 12) genótipo heterozigoto (1A/5).

Os três genótipos foram identificados na população de estudo. A distribuição genotípica bem como suas frequências entre os estados e regiões é mostrada na tabela 5.7 e figura 5.6. Os resultados mostram que houve uma predominância e homogeneidade do alelo selvagem (*1A), que caracteriza hidroxilação rápida, em todas as regiões bem como uma alta frequência do genótipo selvagem (1A/1A).

Tabela 5.7: Frequências dos genótipos e alelos de *CYP2E1* por estado e região.

Estado/Região	Genótipos <i>CYP2E1</i>			Total de amostras	Alelos		Total de cromossomos
	Homozigoto Selvagem	heterozigoto	Homozigoto Mutante		*1A (-1053C)	*5 (-1053T)	
	1A/1A N (%)	1A/5 N (%)	5/5 N (%)		N (%)	N (%)	
RO	58 (87,87)	7 (10,60)	1 (1,51)	66	123 (93,18)	9 (6,81)	132
AC	42 (87,5)	6 (12,5)	0 (0,00)	48	90 (93,75)	6 (6,25)	96
TO	54 (75)	17 (23,61)	1 (1,38)	72	125 (86,80)	19 (13,19)	144
REGIÃO NORTE	154 (82,79)	30 (16,12)	2 (1,07)	186	338 (90,86)	34 (9,13)	372
PE	19 (90,47)	2 (9,52)	0 (0,00)	21	40 (95,23)	2 (4,76)	42
RN	21 (77,77)	5 (18,51)	1 (3,70)	27	47 (87,03)	7 (12,96)	54
REGIÃO NORDESTE	40 (83,33)	7 (14,58)	1 (2,08)	48	87 (90,62)	9 (9,37)	96
RJ	234 (87,96)	31 (11,65)	1 (0,37)	266	499 (93,79)	33 (6,20)	532
ES	59 (85,5)	10 (14,49)	0 (0,00)	69	128 (92,75)	10 (7,24)	138
REGIÃO SUDESTE	293 (87,46)	41 (12,23)	1 (0,29)	335	627 (93,58)	43 (6,41)	670
PR	9 (90,00)	1 (10,00)	0 (0,00)	10	19 (95,00)	1 (5,00)	20
REGIÃO SUL	9 (90,00)	1 (10,00)	0 (0,00)	10	19 (95,00)	1 (5,00)	20
BRASIL	496 (85,66)	79 (13,64)	4 (0,69)	579	1071 (92,48)	87 (7,51)	1158

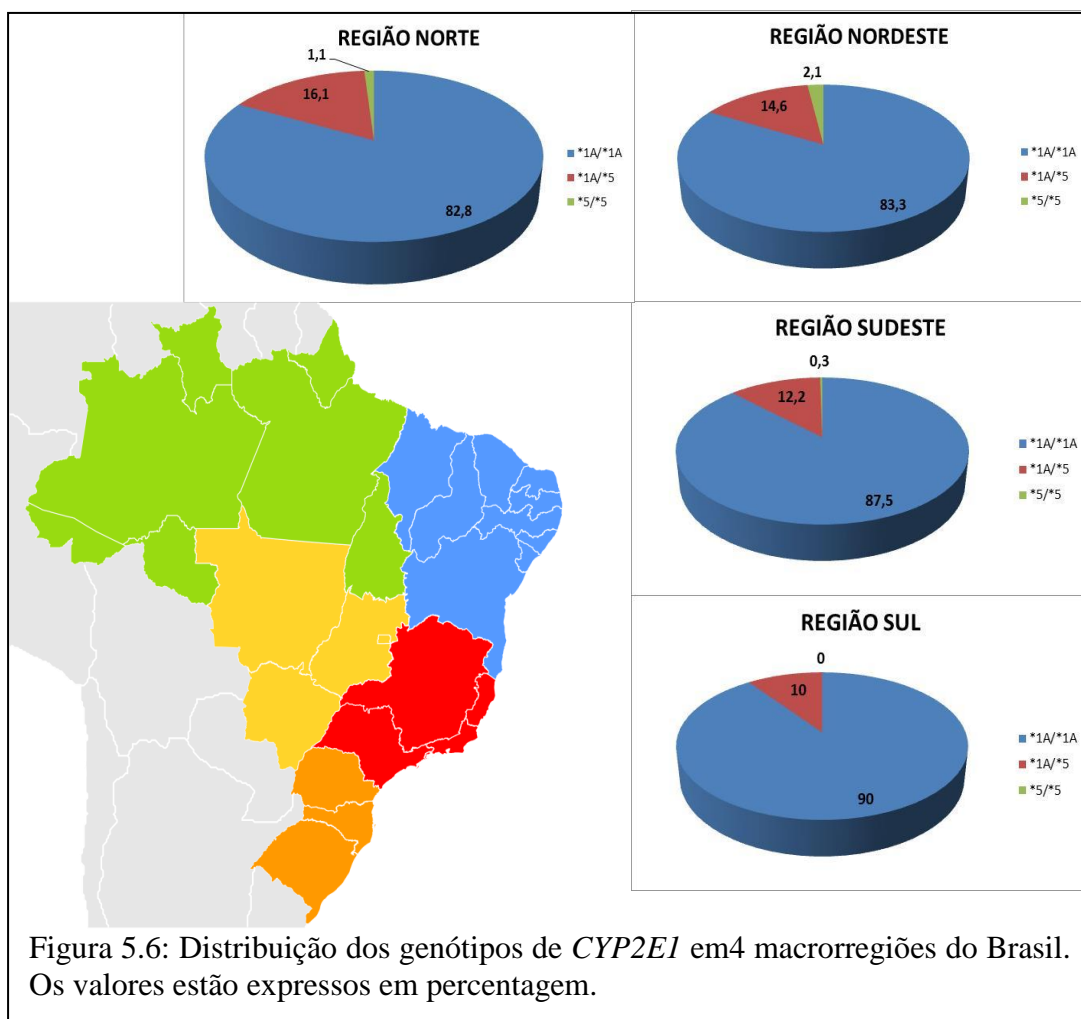


Figura 5.6: Distribuição dos genótipos de *CYP2E1* em 4 macrorregiões do Brasil. Os valores estão expressos em percentagem.

5.3.2- *CYP3A5* (*3 e *6)

As frequências alélicas e genóticas do gene *CYP3A5* (*3 e *6) foram calculadas com base na genotipagem de 577 indivíduos (*CYP3A5**3) e 580 indivíduos (*CYP3A5**6) provenientes dos estados: RO, AC, TO, PE, RN, RJ, ES e PR.

Para a genotipagem do SNP A→G *CYP3A5**3, no intron 3, e do SNP G→A *CYP3A5**6, no exon 7 foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, como descrito na seção de Pacientes e Métodos. Os três perfis eletroforéticos para cada polimorfismo foram identificados na amostragem em estudo e podem ser observados nas figuras 5.7 e 5.8 respectivamente.

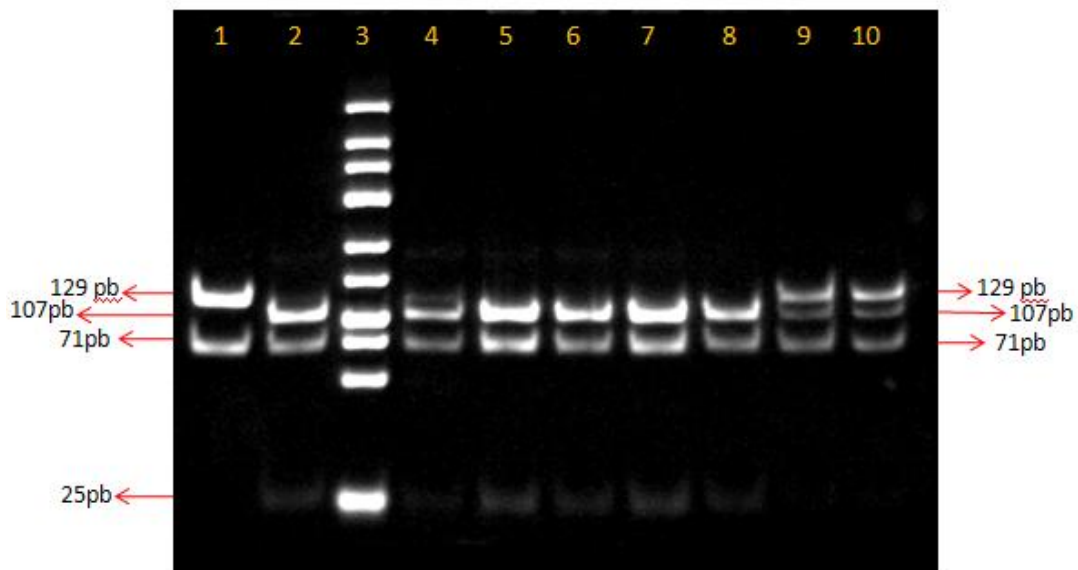


Figura 5.7: Gel de poliácridamida 15% mostrando o perfil eletroforético das amostras digeridas com *Dde* I para genotipagem de *CYP3A5**3. (1) genótipo selvagem (*1/*1); (2,4,5,6,7 e 8) genótipo mutante homozigoto (*3/*3); (9,10) genótipo heterozigoto (*1/*3); (3) Marcador de peso molecular de 25pb.

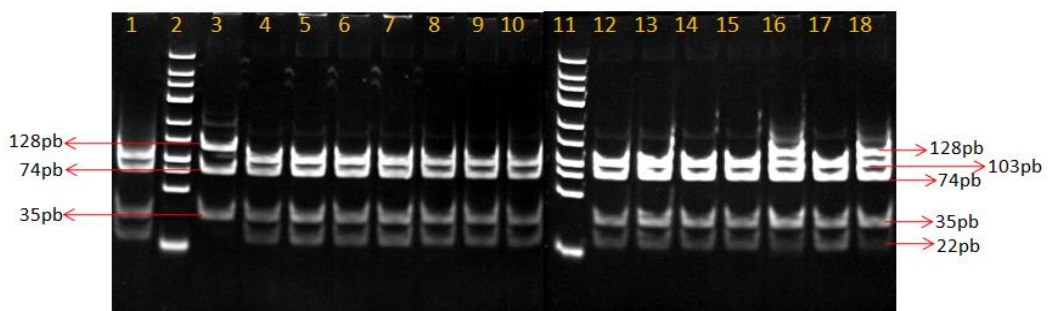


Figura 5.8: Gel de poliácridamida 15% mostrando o perfil de digestão com *Dde* I para determinação dos três genótipos de *CYP3A5**6: (1;4-15;17) genótipo selvagem (*1/*1); (3) genótipo mutante homozigoto; (16 e 18) genótipo heterozigoto; (2 e 11) Marcador de peso molecular de 25pb.

A distribuição genotípica desses dois polimorfismos bem como suas frequências entre os estados e regiões é mostrada nas tabelas 5.8 e 5.9; figuras 5.9 e 5.10. Os



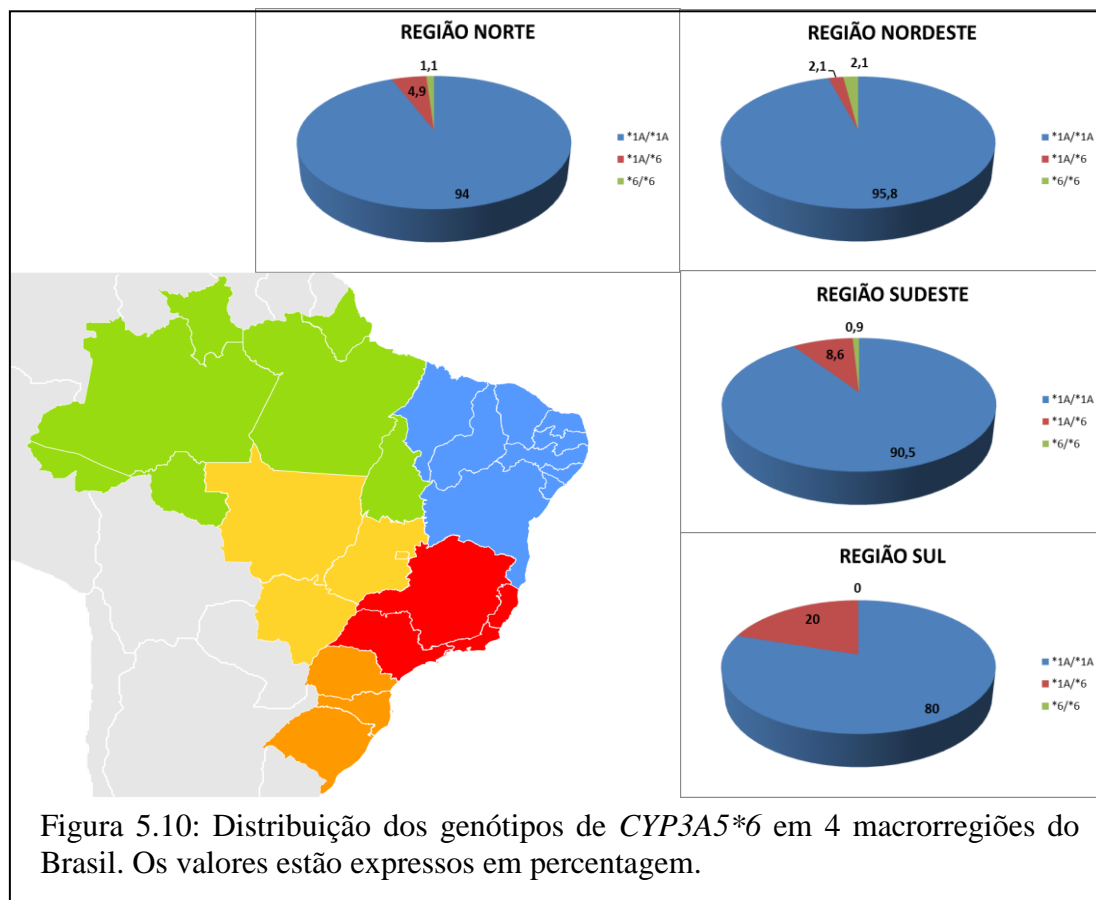
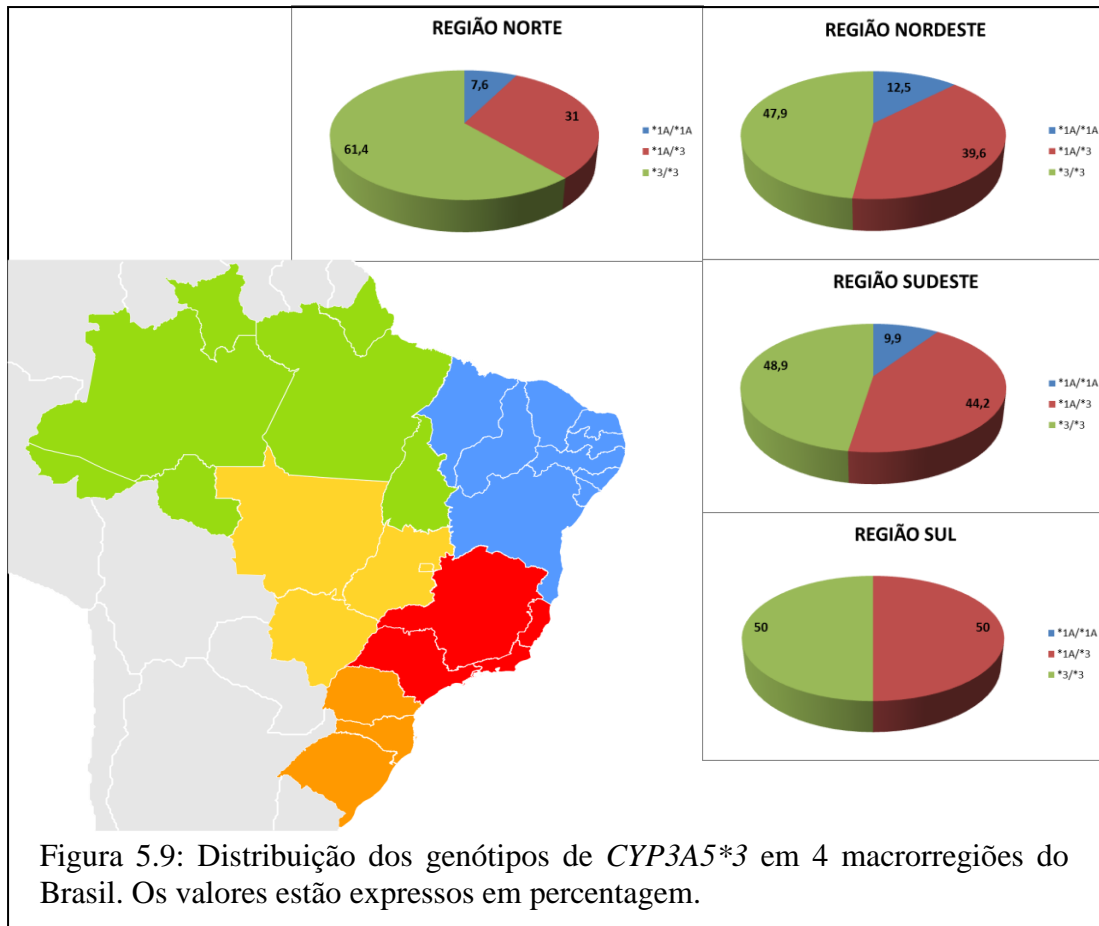
resultados mostram uma alta variabilidade do gene *CYP3A5**3 na população de estudo enquanto que *CYP3A5**6 se apresentou muito conservado.

Tabela 5.8: Frequências dos genótipos de *CYP3A5**3 por estado e região.

<i>CYP3A5</i> *3	Genótipos			Alelos			Total de cromossomos
	Homozigoto Selvagem	heterozigoto	Homozigoto Mutante	*1A	*3		
	1A/1A	1A/3	3/3	Total de amostras	N (%)	N (%)	
Estado/Região	N (%)	N (%)	N (%)				
RO	4 (6,25)	19 (29,68)	41 (64,06)	64	27 (21,09)	101 (78,90)	128
AC	4 (8,33)	17 (35,41)	27 (56,25)	48	25 (26,04)	71 (73,95)	96
TO	6 (8,33)	21 (29,16)	45 (62,55)	72	33 (22,91)	111 (77,08)	144
REGIÃO NORTE	14 (7,60)	57 (30,97)	113 (61,41)	184	159 (43,20)	209 (56,79)	368
PE	3 (14,28)	11 (52,38)	7 (33,33)	21	17 (40,47)	25 (59,52)	42
RN	3 (11,11)	8 (29,62)	16 (59,25)	27	14 (25,92)	40 (74,07)	54
REGIÃO NORDESTE	6 (12,50)	19 (39,58)	23 (47,91)	48	31 (32,29)	65 (67,70)	96
RJ	25 (9,3)	124 (46,61)	117 (43,98)	266	174 (32,70)	358 (67,29)	532
ES	8 (11,59)	24 (34,78)	37 (53,62)	69	40 (28,98)	98 (71,01)	138
REGIÃO SUDESTE	33 (9,85)	148 (44,18)	154 (45,97)	335	214 (31,94)	456 (68,06)	670
PR	0 (0,00)	5 (50,00)	5 (50,00)	10	5 (25,00)	15 (75,00)	20
REGIÃO SUL	0 (0,00)	5 (50,00)	5 (50,00)	10	5 (25,00)	15 (75,00)	20
BRASIL	53 (9,18)	229 (39,68)	295 (51,13)	577	409 (35,49)	745 (64,55)	1154

Tabela 5.9: Frequências dos genótipos de *CYP3A5**6 por estado e região.

<i>CYP3A5</i> *6	Genótipos			Alelos			Total de Cromossomos
	Homozigoto Selvagem	heterozigoto	Homozigoto Mutante	*1A	*6		
	1A/1A	1A/6	6/6	Total de amostras	N (%)	N (%)	
Estado/Região	N (%)	N (%)	N (%)				
RO	63 (96,92)	1 (1,53)	1 (1,53)	65	127 (97,69)	3 (2,30)	130
AC	41 (85,41)	7 (14,58)	0 (0,00)	48	89 (92,70)	7 (7,29)	96
TO	70 (97,22)	1 (1,38)	1 (1,38)	72	141 (97,91)	3 (2,08)	144
REGIÃO NORTE	174 (94,05)	9 (4,86)	2 (1,08)	185	357 (96,48)	13 (3,51)	370
PE	21 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	21	42 (100,00)	0 (0,00)	42
RN	25 (92,59)	1 (3,70)	1 (3,70)	27	51 (94,44)	3 (5,55)	54
REGIÃO NORDESTE	46 (95,83)	1 (2,08)	1 (2,08)	48	93 (96,87)	3 (3,13)	96
RJ	243 (90,67)	23 (8,58)	2 (0,74)	268	509 (94,96)	27 (5,03)	536
ES	62 (89,85)	6 (8,69)	1 (1,44)	69	130 (94,20)	8 (5,79)	138
REGIÃO SUDESTE	305 (90,50)	29 (8,60)	3 (0,89)	337	639 (94,80)	35 (5,19)	674
PR	8 (80,00)	2 (20,00)	0 (0,00)	10	18 (90,00)	2 (10,00)	20
REGIÃO SUL	8 (80,00)	2 (20,00)	0 (0,00)	10	18 (90,00)	2 (10,00)	20
BRASIL	533 (91,89)	41 (7,06)	6 (1,03)	580	1065 (91,81)	95 (8,18)	1160





5.3.3- *CYP3A4*1B*

A genotipagem do SNP A→G, na posição -290, da região promotora (5'PR) do gene *CYP3A4*, foi realizada através de sequenciamento direto do produto da PCR (385pb) (Figura 5.11), em 562 amostras de DNA de indivíduos provenientes dos estados de RO, AC, TO, PE, RN, RJ, ES e PR.

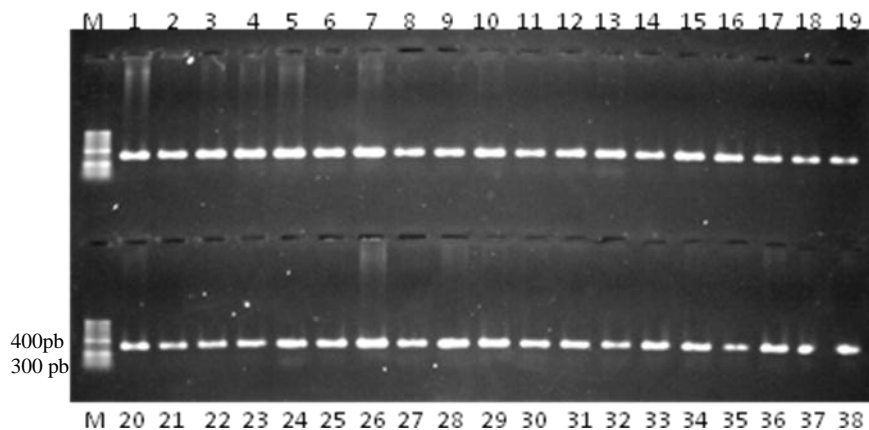
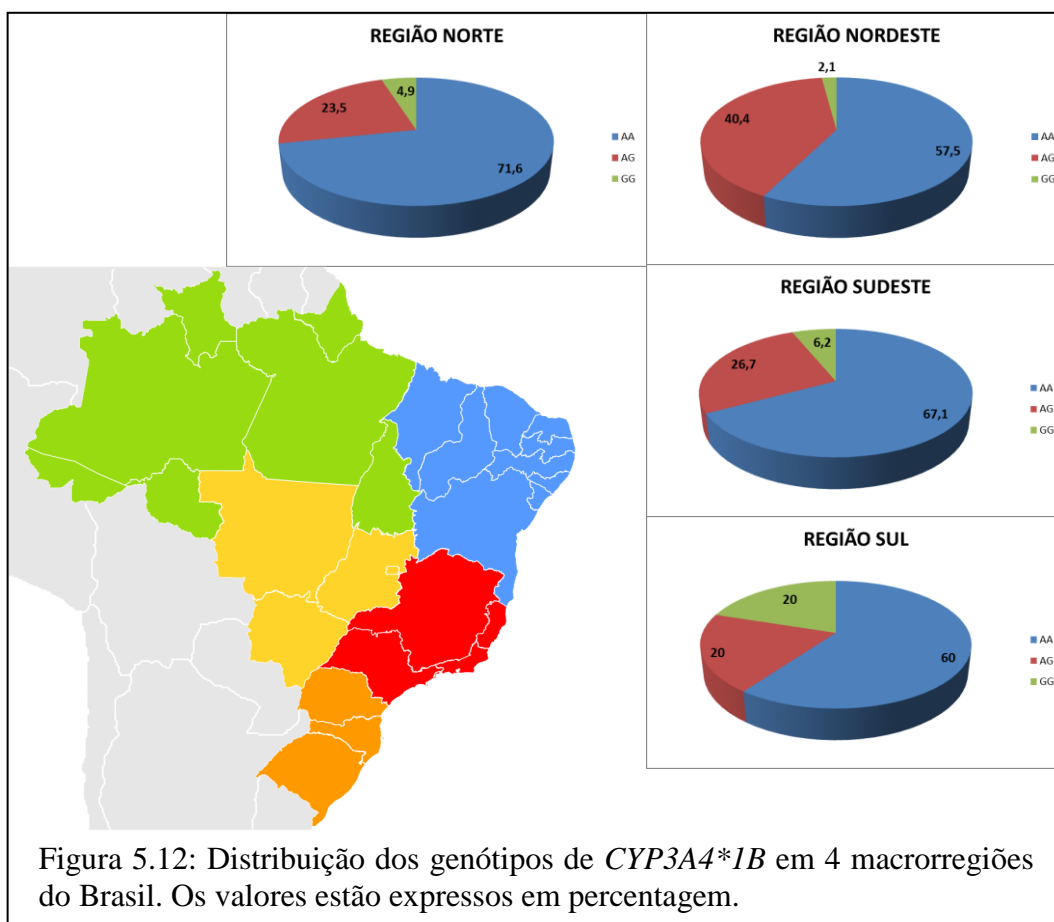


Figura 5.11: Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos amplificados do fragmento de 385pb da região flanqueando o alelo variante 5'PR (*CYP3A4*1B*) em diferentes amostras de DNA. (M) marcador de peso molecular 100pb; (1-38) diferentes amostras de DNA.

A distribuição genotípica e alélica bem como suas frequências entre os estados e regiões é mostrada na tabela 5.10 e figura 5.12. Podemos observar uma variação do alelo *G entre os estados de 14,78 a 30,0%, e de 16,66 a 30,0% entre as regiões. No Brasil, a frequência foi de 19,03% mostrando uma predominância do alelo selvagem.

Tabela 5.10: Frequências dos genótipos de *CYP3A4*1B* por estado e região.

Estado/Região	Genótipos			Total de amostras	Alelos		Total de cromossomos
	Homozigoto Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto Mutante		* A	* G	
	AA N (%)	AG N (%)	GG N (%)		N (%)	N (%)	
RO	46 (71,87)	15 (23,43)	3 (4,68)	64	107 (83,59)	21 (16,40)	128
AC	32 (66,66)	13 (27,08)	3 (6,25)	48	77 (80,20)	19 (19,79)	96
TO	53 (74,64)	15 (21,12)	3 (4,22)	71	121 (85,21)	21 (14,78)	142
REGIÃO NORTE	131 (71,58)	43 (23,49)	9 (4,91)	183	305 (83,33)	61 (16,66)	366
PE	11 (52,38)	9 (42,85)	1 (4,76)	21	31 (73,80)	11 (26,19)	42
RN	16 (61,53)	10 (38,46)	0 (0,00)	26	42 (80,76)	10 (19,23)	52
REGIÃO NORDESTE	27 (57,44)	19 (40,42)	1 (2,12)	47	73 (77,65)	21 (22,34)	94
RJ	170 (66,66)	67 (26,27)	18 (7,05)	255	407 (79,80)	103 (20,19)	510
ES	46 (68,65)	19 (28,35)	2 (2,98)	67	111 (82,83)	23 (17,16)	134
REGIÃO SUDESTE	216 (67,08)	86 (26,70)	20 (6,21)	322	518 (80,43)	126 (19,56)	644
PR	6 (60,00)	2 (20,00)	2 (20,00)	10	14 (70,00)	6 (30,00)	20
REGIÃO SUL	6 (60,00)	2 (20,00)	2 (20,00)	10	14 (70,00)	6 (30,00)	20
BRASIL	380 (67,61)	150 (26,69)	32 (5,69)	562	910 (80,96)	214 (19,03)	1124





5.4- Estudo de associação

Uma vez terminada a análise das frequências dos polimorfismos identificados, procedemos um estudo do tipo caso-controle para a investigação da influência de tais polimorfismos em diferentes desfechos desfavoráveis quando do tratamento da hanseníase com esquema contendo dapsona.

Embora o recrutamento dos pacientes nos diferentes estados tenha sido feito levando em consideração o acompanhamento do tratamento em relação a ocorrência de efeitos adversos, na prática, por problemas operacionais, nem sempre estes dados puderam ser disponibilizados. Assim, para o estudo de associação foram utilizados somente amostras dos estados com informações clínicas de acompanhamento.

Conforme descrito em *Pacientes e Métodos*, foram considerados casos os pacientes que durante o tratamento apresentaram alguma intolerância à dapsona e controles os que não apresentaram. Assim, os 551 pacientes arrolados foram estratificados em casos (n=217) e controles (n=334). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação a ocorrência de efeitos adversos entre os grupos MB *versus* PB, o mesmo ocorrendo em relação ao gênero, homens *versus* mulheres ($p=0,4376$ e $p=0,3449$) O número amostral utilizado para a genotipagem dos diferentes genes variou devido a problemas técnicos de amplificação ou falta de estudos funcionais que permitissem a determinação do fenótipo, como no caso do gene *NAT2*. A tabela 5.11 mostra as informações demográficas e a distribuição dos casos e controles em cada estado e região.

Tabela 5.11: Distribuição e descrição demográfica dos pacientes incluídos no estudo.

Estado/Região	N	Casos	Gênero			Idade	Controles	Gênero		
			F	M				F	M	
RO	44	20	9	11	18 - 61	24	7	17	18-71	
AC	48	16	12	4	19 - 58	32	24	8	20 - 58	
TO	72	24	18	6	22 - 61	48	33	15	23 - 65	
REGIÃO NORTE	164	60	39	21	18 - 61	104	64	40	18-71	
PE	21	10	8	2	18 - 61	11	6	5	23 - 65	
RN	27	9	6	3	33 - 76	18	7	11	41 - 69	
REGIÃO NORDESTE	48	19	14	5	18 - 76	29	13	16	23 - 69	
RJ	270	104	64	40	18 - 90	166	199	135	18 - 90	
ES	69	34	21	13	20 - 87	35	23	12	22 - 89	
REGIÃO SUDESTE	339	138	85	53	18 - 90	201	122	79	18 - 90	
TOTAL	551	217	138	79	18 - 90	334	199	135	18 - 90	



5.4.1- Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e teste de homogeneidade entre os perfís de acetilação de NAT2 e a variabilidade genética dos Citocromos P-450 avaliados neste estudo

5.4.1.1- NAT2

A investigação sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi realizada em todas as amostras através do teste χ^2 e, segundo os resultados para este gene, verificamos que as mesmas estavam em equilíbrio.

Com o objetivo de investigar a homogeneidade das amostras em relação ao perfil de acetilação (fenótipo), procedemos o mesmo teste de homogeneidade utilizado na análise descritiva com base no teste de χ^2 separadamente nos dois grupos (casos e controles). O resultado mostrou uma diferença significativa na distribuição fenotípica ao nível de 5% ($\chi^2 = 7,239$; *p valor* = 0,0301). Para a identificação do alelo (rápido ou lento) discrepante, o teste foi repetido e também apresentou uma diferença significativa ao nível de 5% na distribuição alélica, [$\chi^2 = 4,008$; *p valor* = 0,04550; OR 1,330; IC 95% (1,004 – 1,763)]. A comparação do genótipo homozigoto que caracteriza o perfil de acetilação lento (LL) contra o intermediário e rápido (LR+RR) não apresentou diferença significativa. Contudo, a comparação do genótipo lento agrupando os homozigotos e heterozigotos (LL+LR) contra o rápido homozigoto (RR) apresentou diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 7,229$; *p valor* = 0,0081). De acordo com estes dados, verificamos a dominância do alelo lento (L) em relação ao alelo rápido (R), permitindo assim, para as análises de associação posteriores, o agrupamento dos genótipos (LL+LR) pois os indivíduos que apresentaram pelo menos um alelo lento mostraram 2,4 vezes mais chances de ocorrência de ADRs durante o tratamento [OR 2,4; IC 95% (1,243 - 4,624)] (Tabela 5.12).

5.4.1.2- CYP2E1

Os polimorfismos no gene *CYP2E1* também se apresentaram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles. Os testes de homogeneidade genotípica e alélica também apresentaram diferença estatisticamente significativa na distribuição ao nível de 5% respectivamente [$\chi^2 = 6,324$; *p valor* = 0,0497) e ($\chi^2 = 6,089$; *p valor* = 0,01430)]. Para a avaliação de que alelo estaria associado ao fenótipo de hidroxilação rápida, o alelo *1A testado contra o alelo *5 (hidroxilação lenta) mostrou uma diferença



significativa ao nível de 95% com quase o dobro de chance de o evento ocorrer [$\chi^2 = 5,365$; p valor = 0,0253; OR 1,9; IC 95% (1,129 – 3,168)] (Tabela 5.12).

5.4.1.3- *CYP3A5*3*, *CYP3A5*6* e *CYP3A4*1B*

Os polimorfismos desses genes estavam todos em equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém nenhuma diferença significativa foi observada, o que indicou a importância de um número amostral maior no grupo dos controles nesses genes especificamente e para esta análise (Tabela 5.12).

Tabela 5.12: Influência dos genótipos/fenótipos de *NAT2* e *CYP450* na ocorrência de ADRs na hanseníase durante tratamento com dapsona.

	<i>NAT2</i>	<i>CYP2E1</i>	<i>CYP3A4*1B</i>	<i>CYP3A5*3</i>	<i>CYP3A5*6</i>
p	0,0081	0,0253			
χ^2	7,29	5,365			
OR	2,4	1,9	Após o teste de homogeneidade não encontramos diferenças significativas na		
IC	1,123-4,624	1,129-3,168	distribuição dos genótipos entre os grupos		
Genótipo de risco*	LL ou LR	1A/1A	casos e controles.		
Alelo de risco*	L	1A			

* L = alelo de baixa atividade (acetilação lenta)

R = alelo funcional (acetilação rápida)

5.4.2- Estudo das reações adversas

Após analisar o efeito individual de cada gene na ocorrência de ADRs foi realizado uma análise de interação gene-gene. Com o intuito de observar se o genótipo combinado desses marcadores apresentavam um risco aumentado na ocorrência desses efeitos adversos induzidos pela dapsona, foi realizada uma análise da interação dos fenótipos de acetilação de *NAT2* com os fenótipos de hidroxilação dos diferentes CYPs..

A exemplo do procedimento realizado no estudo descritivo, o primeiro passo foi a avaliação de homogeneidade das amostras com base no teste do χ^2 combinando os diferentes fenótipos de *NAT2* e dos diferentes CYPs. Em todas as análises, após a partição do χ^2 , os subgrupos que apresentaram $n < 5$ foram excluídos.



5.4.2.1- NAT2 / CYP2E1

A comparação entre acetiladores (*NAT2*) e hidroxiladores (*CYP2E1*) mostrou uma diferença significativa ($\chi^2 = 21,73$ e p valor = 0,0028) indicando a não homogeneidade dos subgrupos. Foram identificadas 8 classes diferentes, ou seja, 8 combinações diferentes que após o teste de homogeneidade foram agrupados em subgrupos. O gráfico (Figura 5.13) mostra a proporção de casos, ou seja, a razão do número de casos pelo total de amostra naquela classe. Sendo assim, após a partição do χ^2 , quatro subgrupos distintos, foram obtidos e comparados entre si nos grupos casos e controles.

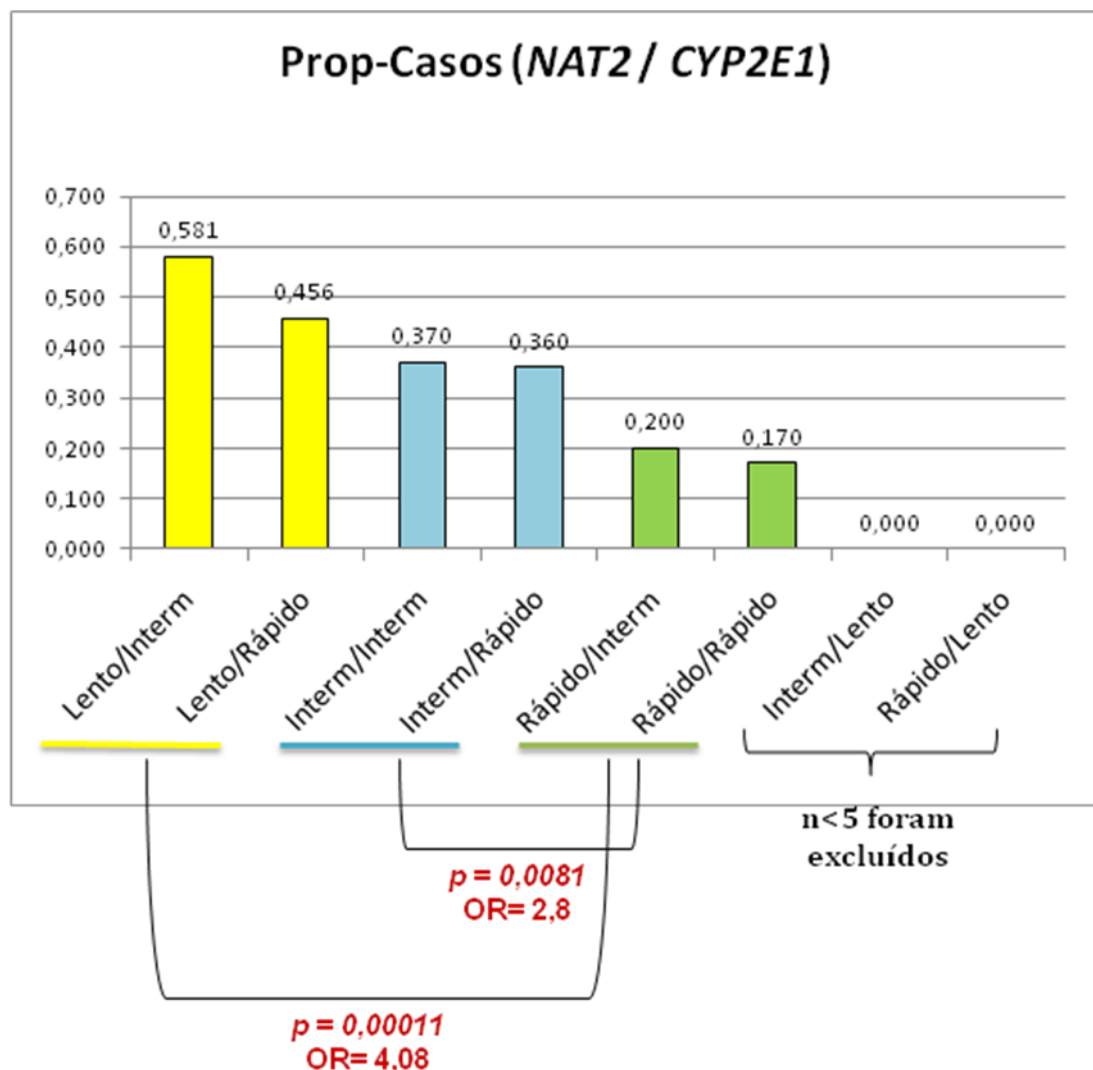


Figura 5.13: Gráfico contendo a proporção de casos (casos/nº amostral) dos diferentes subgrupos obtidos após partição do χ^2 da análise combinada de *NAT2* / *CYP2E1*. Os subgrupos estão representados pelas cores amarela, azul, verde e cinza. O subgrupo cinza foi excluído por conter $n < 5$.



Com base nestes resultados procedemos o cálculo da razão de chance (OR) de ocorrência de ADRs. O subgrupo de acetiladores lentos / hidroxiladores rápidos ou intermediários (amarelo) apresentou 4 vezes mais chance de ocorrência de reações adversas quando comparado ao subgrupo de acetiladores rápidos / hidroxiladores rápidos ou intermediários (verde) [$\chi^2 = 15,17$; pvalor = 0,00011; IC 95% (2,011 – 8,28)].

Quando analisamos o segundo subgrupo de acetiladores intermediários / hidroxiladores rápidos ou intermediários (azul) comparado ao subgrupo de acetiladores rápidos / hidroxiladores rápidos ou intermediários (verde), a chance foi de 2,8 de ocorrência de ADRs [$\chi^2 = 7,86$; p valor = 0,0081; IC 95% (1,36 – 5,72)].

5.4.2.2- NAT2 / CYP3A5*3

Para a análise desta combinação, foi adotado o mesmo procedimento acima. O resultado da comparação entre os acetiladores e hidroxiladores para o locus *CYP3A5*3* foi significativo ($\chi^2 = 29,47$ e *p* valor = 0,0003). Como podemos observar na figura 5.14, novamente a proporção casos pertencentes ao subgrupos de acetiladores lentos / hidroxiladores rápidos ou intermediários (laranja) mostraram-se mais frequentes que as outras combinações. O cálculo da razão de chance mostrou uma probabilidade 6,4 maior de ocorrência de ADRs quando comparados com o grupo de acetiladores rápidos (verde) [$\chi^2 = 14,22$; *p* valor = 0,00018; IC 95% (2,44 – 16,98)]. Enquanto o subgrupo acetiladores intermediários / hidroxiladores lentos/ intermediários ou rápidos (azul) apresentou uma OR de 2,8 de chance de ocorrência de ADRs quando comparados com o terceiro grupo (acetiladores rápidos / hidroxiladores lentos (verde)) [$\chi^2 = 4,93$; pvalor = 0,04550; IC 95% (1,13 – 7,06)].

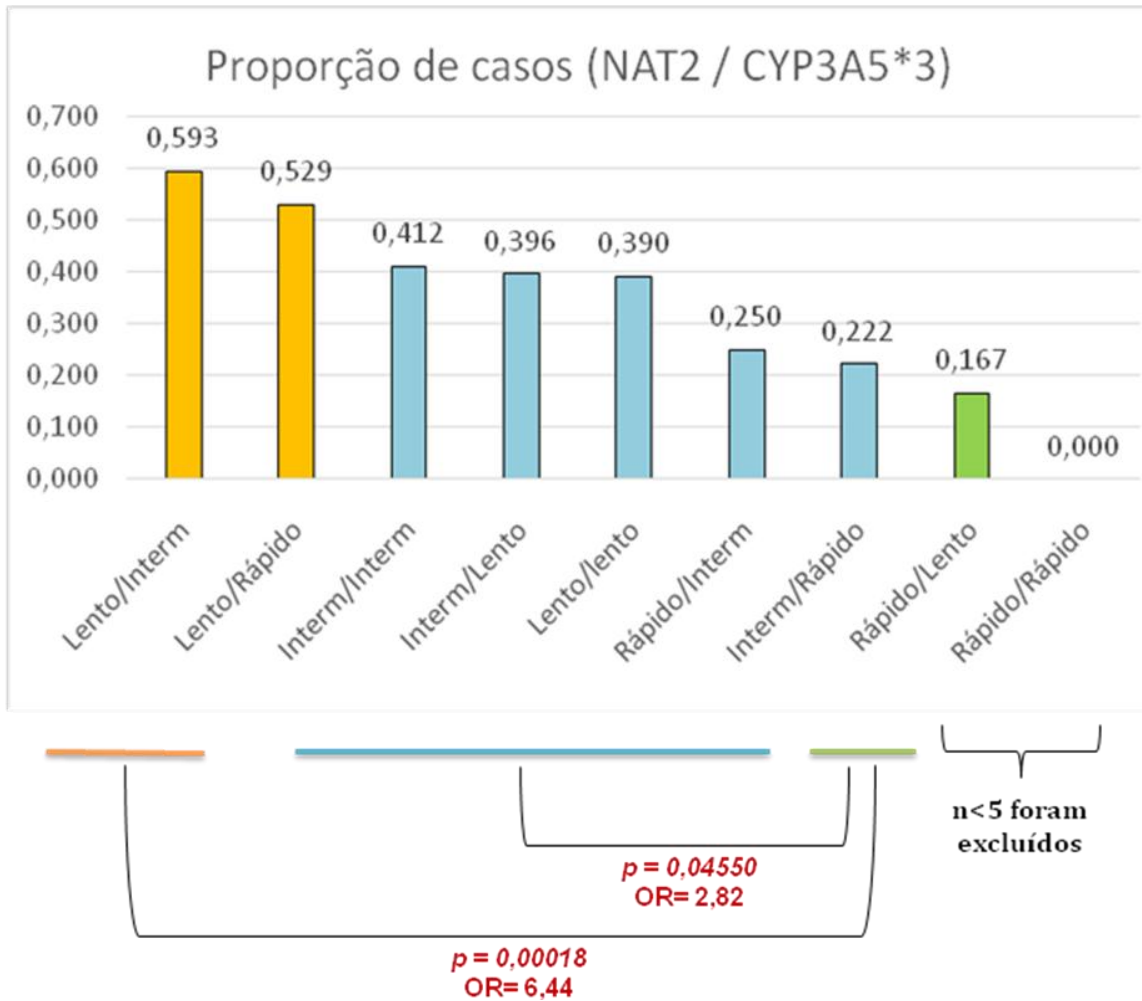


Figura 5.14: Gráfico contendo a proporção de casos (casos/n° amostral) dos diferentes subgrupos obtidos após partição do χ^2 da análise combinada de NAT2 / CYP3A5*3. Os subgrupos estão representados pelas cores laranja, azul, verde e cinza. O subgrupo cinza foi excluído por conter $n < 5$.

5.4.2.3- NAT2 / CYP3A5*6

A proporção de casos nos subgrupos obtidos para esta combinação é mostrada na figura 5.15. Três subgrupos: (1) acetiladores lentos / hidroxiladores intermediários ou rápidos (amarelo); (2) acetiladores intermediários / hidroxiladores rápidos ou intermediários (azul) e (3) acetiladores rápidos / hidroxiladores rápidos (verde) foram utilizados nesta análise. Após o cálculo da razão de chance baseado na comparação entre o subgrupo 1 e o 3 observamos que o subgrupo 1 apresentou 4,83 vezes mais chances de ocorrência de ADRs [$\chi^2 = 16,435$; p valor = 0,000063; IC 95% (2,258 – 10,369)]. Adicionalmente, a comparação entre os subgrupos 2 e 3 mostrou OR de 3,087 [$\chi^2 = 8,257$; p valor = 0,004678; IC 95% (1,431 – 6,658)].

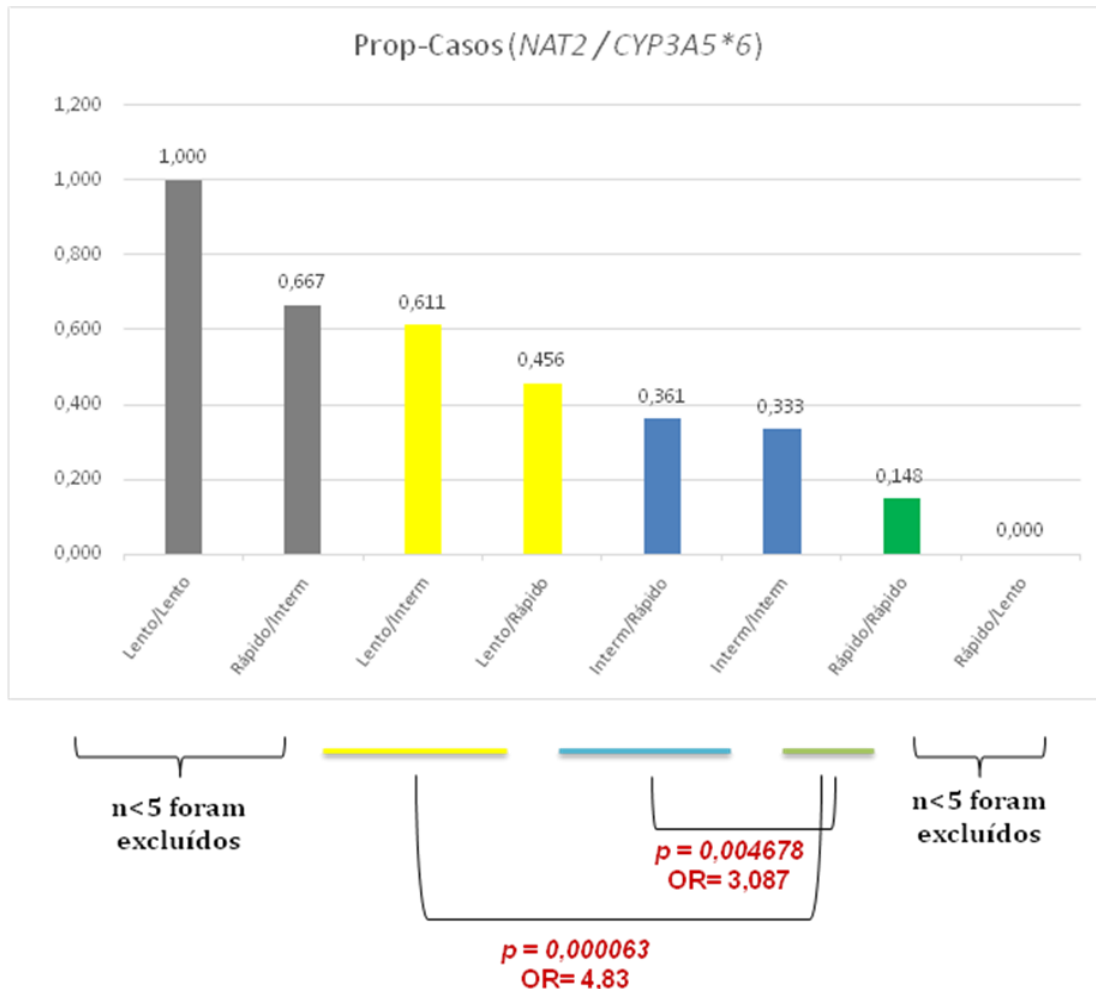


Figura 5.15: Gráfico contendo a proporção de casos (casos/ n° amostral) dos diferentes subgrupos obtidos após partição do χ^2 da análise combinada de $NAT2 / CYP3A5 *6$. Os subgrupos estão representados pelas cores amarela, azul, verde e cinza. O subgrupo cinza foi excluído por conter $n < 5$.

5.4.2.4- $NAT2 / CYP3A4 *1B$

A análise para esse gene se mostrou mais homogênea entretanto o valor do χ^2 continuou significativo (p valor = 0,0022). Após a partição do χ^2 , os indivíduos foram distribuídos em dois subgrupos para análise. (Figura 5.16).

O primeiro grupo foi composto de acetiladores lentos / hidroxiladores rápidos, intermediários ou lentos (laranja) e o segundo grupo composto de acetiladores intermediários / hidroxiladores rápidos e acetiladores rápidos / hidroxiladores rápidos ou intermediários (azul).

A comparação do primeiro grupo com o segundo mostrou uma OR de 2,84 [$(\chi^2 = 28,90$; p valor = 0,0001; IC 95% (1,94 – 4,152)].

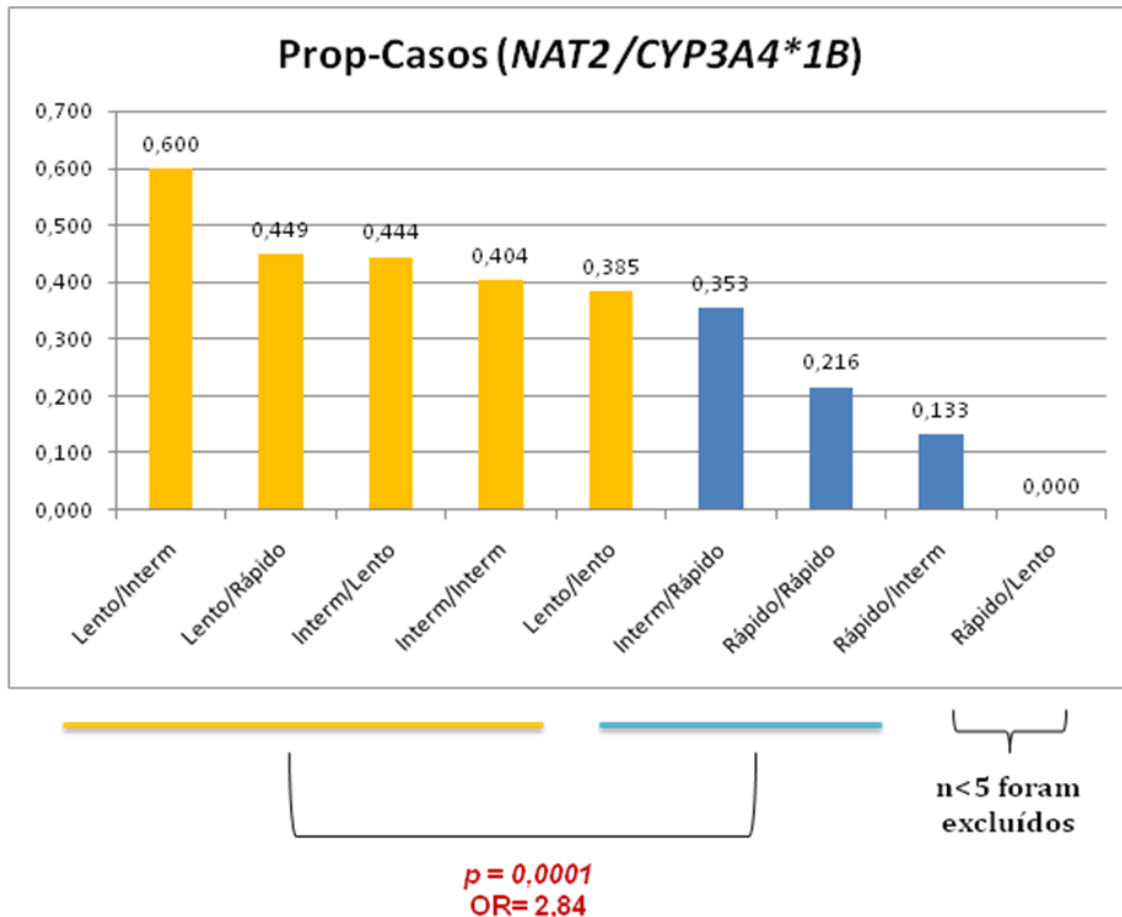


Figura 5.16: Gráfico contendo a proporção de casos (casos/n^o amostral) dos diferentes subgrupos obtidos após partição do χ^2 da análise combinada de *NAT2* / *CYP3A4*1B*. Os subgrupos estão representados pelas cores laranja, azul e cinza. O subgrupo cinza foi excluído por conter $n < 5$.

As diferentes reações adversas identificadas na coorte geral, incluindo todos os estados arrolados no estudo é mostrada na tabela 5.2. Com o objetivo de facilitar a análise, tendo em vista as diferentes apresentações clínicas das ADRs, estratificamos as mesmas em 5 subgrupos: a) hematológicas (n=111), b) hepáticas (n=26), c) cutâneas (n=19), d) neurais (n=3) e e) mista.

A análise das proporções entre os casos, foi realizada somente em 203 dos 217 casos iniciais, tendo em vista que 14 foram excluídos por algumas das razões já mencionadas. Inicialmente foi realizado um teste de homogeneidade entre os perfis de acetilação de *NAT2* no conjunto de ADRs identificadas. Nenhuma diferença significativa foi observada (p valor = 0,713), mostrando que as proporções foram homogêneas entre os subgrupos.

Baseado na hipótese que a maioria das reações hematológicas da dapsona em humanos é supostamente iniciada pela formação de hidroxilamina, mediada pelo



citocromo P450, resolvemos analisar se os acetiladores lentos e os hidroxiladores rápidos tinham influência sobre esse efeito. A mesma análise foi então realizada para avaliar a influência da interação gene-gene comparando o subgrupo de ADRs hematológicas com as não hematológicas. Nenhuma diferença significativa foi observada (Tabela 5.13).

Tabela 5.13: Análise da interação gene-gene no efeito das reações adversas hematológicas.

ADR hematológica	Outras ADRs	Total	Acetilação x Hidroxilação	<i>P</i> valor
todas		203	<i>NAT2</i>	0,713
111	92	203	<i>NAT2/CYP2E1</i>	0,502
99	85	184	<i>NAT2/CYP3A5*3</i>	0,538
111	93	204	<i>NAT2/CYP3A5*6</i>	0,544
109	81	190	<i>NAT2/CYP3A4*1B</i>	0,574

A análise de associação entre os fenótipos caracterizados por *NAT2*, *CYP2E1*, *CYP3A5*3,*6* e *CYP3A4*1B* e as reações adversas separadamente não foi realizada. Adicionalmente, a mesma análise em alguns subgrupos como neural e mista não foi realizada devido ao pequeno número amostral.



6. Discussão

6.1- O tratamento da hanseníase e suas complicações

Conforme descrito anteriormente, o tratamento da hanseníase se baseia em um esquema de poliquimioterapia tendo a dapsona como um dos componentes. Embora a combinação das drogas normalmente seja eficaz, a ocorrência de reações adversas tem se tornado muito frequente, sendo a dapsona a droga mais comumente envolvida com esta intolerância (70,7%) (Jopling, 1983). Contudo, ela ainda é um dos principais componentes do tratamento em virtude de seu baixo custo e elevada eficácia, uma vez que a dose diária de 100 mg proporciona níveis séricos superiores a concentração inibitória mínima (Baohong *et al.*, 1996).

As principais ADRs induzidas pela dapsona estão ligadas a parte hematológica e podem variar em termos de gravidade: desde a meta-hemoglobinemia, que ocorre praticamente em quase todos os pacientes, à agranulocitose fatal. Geralmente, a meta-hemoglobinemia é bem tolerada em baixas doses de dapsona, mas pode se tornar um problema sério em doses excedendo 200mg/dia (Coleman, 1993). Em nosso estudo, entre os casos de ADRs, predominaram as reações hematológicas (54,83%), corroborando os dados da literatura. Dentre estas, a anemia hemolítica foi a mais prevalente e variou substancialmente dependendo da região e estado avaliados (0 – 67,64%). No Acre, embora esta ADR não tenha sido observada, a prevalência de Síndrome da dapsona foi alta (43,75%) , o que pode mascarar a ocorrência da anemia hemolítica, eventualmente presente nesta síndrome. Outro dado a ser destacado foi a variação encontrada os municípios RJ e Campos onde a prevalência de anemia hemolítica foi de 2,27% e 50% respectivamente. No caso específico do RJ, embora esta ADR tenha sido pouco observada, houve uma alta prevalência de anemia e anemia intensa (65%).

Outro grupo de ADRs importante apresenta-se clinicamente associado ao fígado (ADRs hepáticas). Tendo em vista que a metabolização da dapsona é baseada nos processos de acetilação e hidroxilação, ambos acontecendo no fígado para onde a dapsona é transportada assim que é absorvida, era de se esperar que a frequência de ADRs hepáticas fosse alta. Contudo, em nosso estudo, isto não aconteceu, uma vez que estas ADRs foram observadas em apenas 12,8% dos casos. Uma das possíveis explicações para esta observação está ligada ao manejo clínico dos pacientes hansenianos. Como as ADRs hematológicas normalmente são as primeiras a serem observadas, a dapsona é imediatamente retirada do esquema tradicional evitando a ocorrência de intolerância no fígado.



6.2- Influência da variabilidade genética na ocorrência de ADRs na hanseníase

Sabe-se hoje que as diferenças interindividuais na resposta terapêutica, na suscetibilidade a doenças, incidência de efeitos colaterais e interações medicamentosas são características multifatoriais, contudo o *background* genético é um dos principais influenciadores para estes desfechos. Em relação aos desfechos terapêuticos desfavoráveis quando do tratamento com drogas, a variabilidade de genes que codificam para enzimas metabolizadoras (fases I e II), transportadoras, ou modificadoras, tem sido associada em grande proporção como nexo causal. Assim, a identificação de marcadores genéticos que possam predizer a ocorrência de tais desfechos terapêuticos em relação a uma determinada droga é de grande valia para a segurança e eficácia do tratamento. Em relação à dapsona, dados da literatura indicam que todos os efeitos tóxicos principalmente o hematológico estão ligados ao seu metabólito tóxico hidroxilamina, produto da N-hidroxilação mediada por algumas enzimas do citocromo P450 (Coleman *et al.*, 1992), o que demonstra a importância da investigação não somente do gene *NAT2* como também de alguns genes da família CYP-450.

6.2.1- Variabilidade genética do gene *NAT2* no Brasil

Com o objetivo de analisar a variabilidade genética do gene *NAT2* em indivíduos provenientes de diferentes regiões do Brasil e determinar os perfis de acetilação predominantes, amostras de DNA oriundas de indivíduos residentes nos estados do RJ, ES, GO, TO, AC, RO, PE, RN, PR e RS foram genotipadas.

Através da genotipagem por sequenciamento foram identificados 23 SNPs já descritos na literatura, dentre os quais encontram-se os sete SNPs mais frequentes observados em diferentes populações mundiais. Utilizando amostras de diferentes regiões do Brasil conseguimos identificar os SNPs étnico-específicos, tais como: 191G>A; 341 T>C e G857A (Tabela 5.3 e figura 5.3).

Vários SNPs com função reconhecida na determinação de fenótipos de acetilação tem sido observados em frequências significativamente altas em certos grupos étnicos. Em relação a variante 191 G>A (que caracteriza o cluster *NAT2**14), foi inicialmente sugerido por Bell e colaboradores (1993) que teria origem africana por estar completamente ausente em populações eurodescendentes (Bell *et al.*, 1993), o que foi confirmado mais tarde por Delomenie e colaboradores, em 1996 (Delomenie *et al.*, 1996). Outros estudos mostram que a frequência de 191G>A pode variar nas diferentes regiões da África, com um decréscimo na incidência do oeste para o leste africano, ao longo da região Subsaariana (Cavaco *et al.*,



2003). Em nosso estudo, dentre os sete SNPs mais frequentes, o SNP 191 G>A foi o de menor frequência, variando entre 1,7 – 3,6% e não foi encontrado em três estados brasileiros, onde a descendência européia é mais forte (RS, PR e RN).

Em 1993, Lin e colaboradores observaram que o SNP 857G>A caracterizava de 30-33% dos alelos lentos de populações coreanas e chinesas; entretanto, o mesmo caracteriza apenas 1-5% dos alelos lentos em populações eurodescendentes, corroborando a hipótese de que esta mutação originou-se na Ásia (Lin *et al.*, 1993). Posteriormente, em 2002, Jorge-Nerbert e colaboradores mostraram que esse SNP compreende a mutação mais frequente, dentre aquelas responsáveis pela diminuição na atividade de NAT2, em populações ameríndias (Jorge-Nerbert *et al.*, 2002). Em nosso estudo, o SNP 857 G>A foi encontrado em todos os estados analisados com frequências variando de 2,3 – 10%. Os estados com maior frequência desse SNP foram RO (10%); RN (7,4%); TO (6,2%) e AC (5,2%), onde podemos esperar uma maior predominância de população indígena e observar sua influência na constituição genética dos brasileiros.

Os SNPs 341 T>C (cluster *NAT2**5), 481 C>T e 803 A>G estão presentes usualmente em altas frequências entre europeus e africanos enquanto o SNP 590 G>A (cluster *NAT2**6) é mais prevalente em asiáticos (Cascorbi *et al.*, 1995; Dandara *et al.*, 2003; Agúndez *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1997; Sekine *et al.* 2001; Kukongviriyapan *et al.*, 2003; Jorge-Nebert *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 1993; Delomenie *et al.*, 1996; Cavaco *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 1991; Mrozikiewicz *et al.*, 1996; Aynacioglu *et al.*, 1997). O SNP 803 A>G foi o mais frequente na nossa população variando de 15 - 70%, seguido do SNP 341 T>C que variou de 31,4 - 70%. As frequências dos SNPs 481 C>T e SNP 590 G>A variaram, ao longo do território brasileiro, de 26,2 – 65% e 5 – 28,3%, respectivamente, mostrando, assim, a influência européia no perfil genético de *NAT2* na população brasileira. Vale ressaltar que para o estado do Paraná foram incluídos somente dez indivíduos, fato que desviou para mais (341 T>C, 481 C>T e 803 A>G) ou para menos (191 G>A, 590 G>A, 857 G>A) as frequências observadas. A inclusão de mais indivíduos provenientes deste estado seria de grande importância para a confirmação destes dados. Uma outra observação importante foi a homogeneidade dos estados do RS e RN que apresentaram apenas os seis dos sete SNPs mais frequentes. Avaliando os SNPs em relação ao efeito na atividade enzimática, verificamos que a frequência daqueles associados a baixa atividade foi mais elevada no RN (77,8%) em comparação com o RS (44,6%).

A variabilidade do gene *NAT2* no que se refere aos polimorfismos aqui descritos já havia sido demonstrada em estudo prévio realizado em nosso grupo. Em 2007, Teixeira e



colaboradores, comparando a diversidade alélica de *NAT2* entre indivíduos residentes no Rio de Janeiro e Goiás demonstraram claramente a heterogeneidade da nossa população, atribuindo esta diferença aos diferentes grupos étnicos presentes quando da constituição de nossa população na época da colonização (Teixeira *et al.*, 2007), embora neste estudo somente dois estados (RJ e GO) estavam representados. Outro estudo realizado em colaboração com pesquisadores da FEPES-RS mostrou também o retrato genético deste gene no RS (Possuelo *et al.*, 2008). A comparação destes dados, originalmente provenientes de estudos de associação com ADRs em TB induzidas pela isoniazida, enfatizou ainda mais a importância desta avaliação em populações provenientes de diferentes regiões do Brasil. Os resultados encontrados neste estudo corroboram totalmente com os encontrados pelos pesquisadores citados esclarecendo adicionalmente esta diversidade nas diferentes regiões do Brasil.

De acordo com a genética molecular de *NAT2*, onde os alelos são caracterizados pela combinação de dois a quatro SNPs, a caracterização haplotípica é primordial para a predição do fenótipo de acetilação. Assim, após a caracterização haplotípica, foram identificados 45 alelos/haplótipos distribuídos diferentemente entre os estados e regiões. O mais frequente foi o alelo *NAT2*5B* (26,4%), seguido do *NAT2*4* (16,75%) e *NAT2*6A* (14,26%), os mesmos identificados por Teixeira e colaboradores, com pequenas diferenças em suas frequências. Os haplótipos com fenótipos não determinados apresentaram baixa frequência (6,2%). Em complemento, nossos dados estão em consonância com os encontrados por Sabbagh e colaboradores (2011), que avaliou a diversidade genética de *NAT2* em 99 amostras populacionais. Os autores demonstraram a predominância do alelo *NAT2*4* seguido dos alelos **5B* e **6A*. Em nossa avaliação, estes alelos também foram os mais representativos, embora em frequências diferentes.

Entre os alelos funcionais, o *NAT2*4* foi o mais frequente em todos os estados, com exceção do RS, cujo fenótipo de acetilação rápida é caracterizado principalmente pelos alelos **13A* e **12B*. A distribuição dos outros alelos funcionais variou na amostragem geral sendo: *NAT2*12A* (6,9%), *NAT2*13A* (6,79%), *NAT2*12B* (2,28%) e *NAT2*12C* (0,73%). Com exceção do alelo **4*, todos os alelos funcionais apresentaram alguma particularidade. O alelo **13A* apresentou-se em baixa frequência na maioria dos estados, com exceção do RS (9,75%) e RJ (Campos + Rio de Janeiro). Nestes municípios, a frequência deste alelo foi três vezes maior no Rio (15,96% versus 4,39%). O alelo **12A*, com frequência baixa na maioria dos estados, em Campos apresenta-se em alta frequência (7,89%). O alelo **12B*, foi encontrado apenas no Rio de Janeiro, TO e RS com frequências de: 0,23%, 0,69 e 8,75%, respectivamente. Finalmente, o alelo **12C* só foi encontrado em RO (0,71%), ES (2,17%) e



Campos (7,02%). Também foi observado que estes quatro alelos não foram encontrados no RN e PR.

Observamos que a maioria dos alelos circulantes na nossa população são os que caracterizam acetilação lenta. Os alelos mais comuns, *NAT2*5B* e *NAT2*6A* como já foi mencionado, foram observados em mais alta frequência, corroborando os achados em indivíduos na África e Europa (Sabbagh *et al.*, 2008; Mortensen *et al.*, 2011).

A partir da determinação dos genótipos, foi possível então inferir os fenótipos de acetilação nos diferentes estados do Brasil. De acordo com os resultados, observamos que a população dos estados do Nordeste (Rio Grande do Norte e Pernambuco); Norte (Rondônia, Acre e Tocantins) e Centro-Oeste (Goiás) apresentam uma maior prevalência de acetiladores lentos (55,6%; 48,6% e 45,7%, respectivamente). No Sudeste, não houve diferença significativa entre os estados; a prevalência de acetiladores lentos foi de: [ES (46,3%) e RJ (39,18%)] e de acetiladores intermediários foi: [RJ (46,12%) e ES (38,8%)], prevalecendo nessa região a o perfil de acetilação intermediária com 44,6%. Surpreendentemente, o estado do Rio Grande do Sul apresentou maior frequência de acetiladores rápidos (37,6%) com diferença estatisticamente significativa quando comparado com os demais estados do Brasil ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa dos perfis de acetilação entre as regiões Norte e Nordeste mostrando homogeneidade entre elas. No entanto, estas regiões mostraram diferença significativa em comparação com a região Sudeste ($p = 0,0396$). Quando comparadas com a região Sul, todas as outras macrorregiões apresentaram diferença significativa com $p < 0,0001$, sendo o maior responsável por esta diferença a alta frequência de acetiladores rápidos. Os resultados mostram a grande diversidade do gene *NAT2* na população brasileira, corroborando os dados da literatura que já demonstraram este fato em diferentes etnias no mundo, inclusive quando da comparação entre somente dois estados brasileiros (Meyer *et al.*, 1997; Jorge-Nebert *et al.*, 2002; Dandara *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2007; Sabbagh *et al.*, 2011).

6.2.2- Variabilidade genética de *CYP2E1* no Brasil

A enzima *CYP2E1*, que é toxicologicamente importante, encontra-se expressa principalmente no fígado. O gene *CYP2E1* é bastante polimórfico e, alguns polimorfismos funcionais podem representar fatores determinantes do risco relativo à hepatotoxicidade mediada por álcool, câncer ou toxicidade induzida por drogas.

O alelo polimórfico *CYP2E1*5B* resulta de uma substituição C>T na posição -1053, na região promotora do gene, e é uma das variantes associadas com a alteração de atividade



enzimática e de níveis de expressão. Este gene tem sido relacionado à ocorrência de doença alcoólica do fígado e câncer de pulmão (Umamaheswaran *et al.*, 2014). Os dados referentes à genotipagem deste polimorfismo em diferentes populações mostram que a frequência do alelo - 1053T varia dependendo da etnia: em indivíduos de procedência africana a mesma variou de 3,1 a 5,9%, na Ásia de 11,4 a 16,5% e em caucasianos de 3,2 a 4,6% (Umamaheswaran *et al.*, 2014). Em nossa população, a frequência deste alelo foi de 7,5%, apresentando diferenças entre os estados (5 a 13,19%). Nossos achados demonstram, mais uma vez, a influência dessas três etnias na distribuição das frequências desse marcador genético ao longo das diferentes regiões do país.

6.2.3- Variabilidade genética dos genes da família CYP3A

As enzimas CYP3A metabolizam cerca de 50 a 60% de todas as drogas comumente prescritas. Esta subfamília é composta por quatro diferentes genes: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43*, dentre os quais, o *CYP3A4* é responsável pela maior porção de proteína CYP3A presente no fígado adulto. Até o momento, 41 alelos de *CYP3A4* já foram identificados, sendo o alelo **1B* (- 4714A>G) o mais estudado. De acordo com os dados da literatura, indivíduos carregando o alelo defeituoso (G), apresentam maior predisposição ao câncer de próstata, câncer de mama e diabetes Mellitus tipo 2 (Lamba *et al.*, 2002). Em nosso estudo, a frequência da variante G foi de 19,03%, variando de 14,78 a 30% entre os estados e de 16,66 a 30% entre as regiões. Em um estudo realizado por Almeida e colaboradores, em 2005, utilizando 212 indivíduos da população brasileira, observou-se uma frequência de 8% para o alelo G. Contudo, neste estudo foram avaliadas somente mulheres brancas eurodescendentes (Almeida *et al.*, 2005). Da mesma forma um estudo conduzido por Cavalli e colaboradores, (2001) analisando um grupo de 90 indivíduos brancos e saudáveis encontrou uma frequência de 13,3% para este alelo (Cavalli *et al.*, 2001).

Dados da literatura indicam uma frequência do alelo *CYP3A4*1B* de 24,1 a 27,9% em africanos, 0,02 a 0,3% em asiáticos e 4,3 a 10,8% em caucasianos. Como podemos observar, a frequência deste alelo na África chega a ser 100 vezes maior que na Ásia e de 2 a 5 vezes maior que em caucasianos. Nossos dados se mantêm entre as frequências das populações africanas e caucasianas, corroborando a grande influência genética na formação parental da nossa população por ambas as etnias.

A isoenzima CYP3A5 representa cerca de 10-30% de todas as CYPs do fígado adulto e, juntamente com CYP3A4, metaboliza mais de 50% das drogas utilizadas na prática clínica. Na nossa população observamos uma grande heterogeneidade dos alelos **3* e **6* do gene



CYP3A5. A frequência do alelo *3 variou de 68% a 75% entre as regiões e 59,5% a 79% entre os estados. No Brasil, levando-se em consideração todos os estados estudados, a frequência foi 64,5%. Dados da literatura reportam diferentes frequências deste alelo em populações africanas (11,3% a 18,2%), asiáticas (78% a 83,3%) e caucasianas (90% a 93,2%) (Wen *et al.*, 2004; Garsa *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Em relação ao alelo *6, verificamos uma homogeneidade maior entre as populações estudadas provenientes dos diferentes estados brasileiros. A frequência entre as regiões variou de 2,8% a 10% e entre os estados de 0% a 10%. No geral, representando o Brasil, a frequência deste alelo foi de 8,18%. Dados da literatura reportam as frequências deste alelo em populações mais homogêneas com valores muito baixos: euro-descendentes 0,006% a 0,5%, asiáticas (0%) e africanas (11% a 17,6%) (Hiratsuka *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Kudzi *et al.*, 2010). O alelo *6, específico de afrodescendentes, foi encontrado em nossa população numa prevalência significativa (8,18%) mostrando o peso da influência deste grupo étnico na formação do *background* genético da nossa população.

6.3- Estudo de associação

A genotipagem de *NAT2* tem sido estudada como método rápido e simples para inferir o fenótipo de acetilação num curto espaço de tempo. Através desse acompanhamento genético, terapias individualizadas para drogas que são metabolizadas por *NAT2* poderiam ser introduzidas na prática clínica, através do ajuste da dosagem do medicamento ou administração de uma droga alternativa de forma a maximizar o efeito terapêutico e reduzir reações adversas no indivíduo sob tratamento.

A monitoração terapêutica também tem sido defendida para um número de medicamentos com o objetivo de individualizar a dosagem. Convencionalmente, baseia-se na informação obtida sobre a concentração do fármaco no plasma de um determinado regime terapêutico e tem uma base racional se a relação entre o nível da droga no plasma e da resposta pode ser estabelecido e o efeito terapêutico atingido.

Vários estudos sobre o efeito da taxa de acetilação na eficácia e toxicidade da dapsona. Embora alguns investigadores não tenham encontrado uma correlação entre o perfil de acetilação e efeitos adversos (Crook *et al.*, 1975; Queiroz *et al.*, 1997), outros sugerem o contrário (Guo *et al.*, 1996; Bluhm *et al.*, 1999). Em 1996, Guo e colaboradores observaram que pacientes com SIDA sob tratamento com dapsona para dermatite herpetiforme, com perfil de acetilação lento apresentavam uma maior incidência de reações adversas (Guo *et al.*, 1996). Outro estudo conduzido por Bluhm e colaboradores em 1999, mediu a taxa de



acetilação e N-hidroxilação em 18 pacientes tratados com dapsona para dermatoses inflamatórias e observaram que quatro pacientes que apresentaram reações adversas eram acetiladores lentos, sendo três destes hidroxiladores rápidos. Provavelmente, indivíduos portadores de um fenótipo de acetilação lenta disponibilizariam altos níveis de metabólitos intermediários para N-hidroxilação, gerando maior quantidade de metabólitos tóxicos.

Uma hipótese seria que a própria MADDS seja um substrato para as enzimas responsáveis pela oxidação da DDS, competindo com a droga. Estudos conduzidos por Israili e colaboradores (1973) e Zuidema e colaboradores (1986) observaram que MADDS também sofre hidroxilação, o que é consistente com essa hipótese. Se isto é verdade, de acordo com Bluhm e colaboradores (1999) a acetilação rápida deve conferir um benefício devido à menor formação de metabólitos tóxicos pela rota metabólica alternativa (hidroxilação).

Isto comprova a importância de avaliarmos a contribuição genética no estudo de associação de efeitos adversos e polimorfismos em genes codificantes para enzimas metabolizadoras de drogas, pois todos esses estudos são baseados em dados farmacocinéticos, nunca foram avaliados tendo como base o *background* genético para a determinação dos perfis de acetilação ou hidroxilação.

Estudos em modelos animais confirmaram a relação entre a dose e o tempo de exposição à hidroxilamina na sobrevivência de células vermelhas (Grossman & Jollow, 1988). A hipótese era que a variabilidade na N-hidroxilação poderia explicar a suscetibilidade individual à toxicidade, e a identificação dos indivíduos com maior capacidade de hidroxilação da dapsona poderia ser muito útil na seleção de pacientes com risco de reações tóxicas. Os níveis de expressão dessas enzimas do citocromo P450 podem ser um determinante importante da suscetibilidade individual para os efeitos tóxicos da dapsona.

A N-hidroxilação da dapsona e seu derivado acetilado foram atribuídos à família de enzimas CYP450 (3A4 e 3A5) (Watkins, 1994). Contudo, outros estudos indicam o envolvimento de outras enzimas, que seriam também capazes de metabolizar a droga, especialmente CYP2E1 (Mitra *et al.*, 1995).

Após estudo de associação entre os genótipos de *NAT2* observamos que indivíduos que apresentavam pelo menos um alelo lento mostraram 2,4 vezes a chance de terem reações adversas [IC 95% (1,243 - 4,624)]. Quando observamos a influência genética dos diferentes marcadores da família CYP450, apenas encontramos associação com a ocorrência de ADRs para o polimorfismo identificado em *CYP2E1* [OR 1,9; IC 95% (1,129 – 3,168)].

Na análise do efeito da combinação entre os fenótipos de acetilação (*NAT2*) e hidroxilação (*CYP2E1*; *CYP3A5**3 e *6 e *CYP3A4**1B) na ocorrência de ADRs em pacientes



hansenianos, observamos associação dos acetiladores lentos com todos os hidroxiladores rápidos dos diferentes citocromos P450. *NAT2/CYP2E1* apresentou uma razão de chance (OR) quatro vezes maior de ocorrência de reações adversas, com IC 95% (1,36-5,72); *NAT2/CYP3A5*3 e *6* apresentaram ORs de 6,4 e 4,83, respectivamente, com IC 95% [(2,44-16,98) e (2,258-10,369)] e *NAT2/CYP3A4*1B* apresentou OR de 2,84 e IC 95% (1,94-4,152). Esses dados sugerem a participação de enzimas com alta capacidade de hidroxilação na geração de metabólitos tóxicos naqueles indivíduos com perfil de acetilação lenta, aumentando ainda mais o risco de ocorrência de ADRs durante o tratamento com dapsona.

De fato, nossos resultados foram consistentes com as hipóteses citadas acima, e sugerem que embora a acetilação possa não produzir diretamente a toxicidade, aqueles indivíduos que apresentam uma combinação de genótipo/fenótipo de acetilação lenta / hidroxilação rápida podem gerar níveis altos de metabólitos tóxicos, corroborando com o estudo de Bluhm e colaboradores (1999) e de Mitra e colaboradores (1995).

Observamos que as reações hematológicas foram as mais prevalentes dentre as reações adversas observadas no estudo (54,68%), seguida das hepáticas (12,8%) e cutâneas (9,36%). Baseado na hipótese que as reações hematológicas estão associadas à dapsona hidroxilamina, gerada pelas enzimas *CYP2E1*, *CYP3A4* e *CYP3A5*, resolvemos avaliar a associação dos acetiladores lentos e hidroxiladores rápidos com a ocorrência isolada dos diferentes tipos de reações adversas.

Em um primeiro momento, analisamos a associação dos perfis de acetilação com a ocorrência de algum tipo específico de ADR. Como não houve diferenças significativas resolvemos olhar para a combinação entre os acetiladores lentos e hidroxiladores rápidos decorrentes dos diferentes CYPs estudados e avaliar a interação gene-gene no efeito da ADR hematológica em relação às outras. Da mesma forma, para *CYP2E1*, *CYP3A5*3 e *6 e CYP3A4*1B* também não observamos diferenças significativas dos fenótipos de acetilação e hidroxilação entre as ADRs hematológicas e as outras. Contudo, análises adicionais ainda se fazem necessárias para avaliação desta combinação levando-se em consideração os diferentes grupos de ADRs contra o grupo controle, bem como dos tipos de ADRs, quando o número amostral permitir.

Baseado nos dados descritos neste estudo, a associação dos perfis de acetilação e hidroxilação com a ocorrência de ADRs mostra claramente, que a toxicidade (intolerância à dapsona) está relacionada com a produção de um metabólito ativo conforme descrito por (Grossman & Jollow, 1988; Coleman, 1995; Jollow *et al.*, 1995) e que a maior capacidade metabólica de hidroxilação aumenta o risco da toxicidade.



O estudo de farmacogenética aplicada a hanseníase como modelo de doença é inédito e pioneiro e mostra a influência da variabilidade genética de pacientes hansenianos na ocorrência de efeitos adversos induzidos por dapsona. Os dados obtidos são de importância fundamental tanto na parte clínica, com a descrição do percentual de ADRs e seus diferentes tipos, distribuição por gênero, idade, forma clínica (operacional) e entre populações residentes em diferentes regiões do país quanto na epidemiologia molecular de genes metabolizadores de drogas.

Levando-se em consideração a problemática do tratamento da hanseníase em relação a sua combinação de drogas, padronização da mesma e da posologia, nossos dados comprovam a diversidade de nossa população, em relação a outras populações etnicamente homogêneas, mostrando que os dados de epidemiologia molecular não devem ser importados. Mostramos as diferentes prevalências de ADRs nos estados e regiões analisados e sua associação com os genes estudados, fornecendo o embasamento clínico/experimental para uma reavaliação da conduta ora adotada.

A utilização destes dados certamente contribuirá com informações importantes para a avaliação de uma conduta terapêutica individualizada e um melhor manejo do tratamento na hanseníase. Tais medidas permitiriam uma melhor adesão ao tratamento, evitando o abandono por parte dos pacientes, a redução do surgimento de bactérias resistentes e conseqüentemente um maior controle da infecção pelo *M. leprae*. Adicionalmente, teríamos ainda como benefício uma redução no custo do tratamento das ADRs, a possibilidade de uma previsão de medicamentos mais realista, melhoria da qualidade do tratamento em relação a eficácia e segurança, resultando na igual melhoria da qualidade de vidas dos pacientes acometidos por esta doença, ainda hoje, tão estigmatizante.



7. Conclusões

Verificou-se que as reações hematológicas foram as mais prevalentes (54,23%) dentre todas as ADRs observadas com destaque para anemia e anemia hemolítica.

Foram identificados 23 SNPs na região codificante de *NAT2*, incluindo os SNPs étnico específicos, mostrando a alta variabilidade deste gene e a miscigenação da população brasileira.

A variação dos perfis de acetilação de acordo com a região estudada corroborou a hipótese da alta variabilidade genética e demonstra claramente a importante contribuição que uma avaliação genética prévia ao início do tratamento pode dar em termos prognósticos para a ocorrência de ADRs induzidas pela DDS.

O perfil de acetilação lenta, assim como o perfil de hidroxilação rápida (*CYP2E1*), avaliados separadamente já demonstram uma associação com a ocorrência de ADRs, porém com Razões de Chance menores (2,4 e 1,9) que na análise combinada (4,08 para *CYP2E1*; 6,4 para *CYP3A5*3*; 4,83 para *CYP3A5*6* e 2,84 para *CYP3A4*1B*).

O perfil de acetilação intermediária foi o predominante no Brasil (45,3%), seguido de acetiladores lentos (44,9%) e acetiladores rápidos (21,4%).

A combinação entre os perfis fenotípicos de acetilação lenta com hidroxilação rápida representam o algoritmo ideal para uma proposta de teste preditivo a ser utilizado como suporte no tratamento da hanseníase com esquema contendo DDS.



8. Perspectivas futuras

Avaliar a possível associação entre os fenótipos de CYP de hidroxilação rápida com os diferentes tipos de ADRs.

Aumentar a representatividade do estudo através da inclusão de pacientes de outros estados.

Agrupar os tipos de ADRs de acordo com a apresentação clínica do paciente.

Proposta para elaboração de uma plataforma de farmacogenética aplicada a hanseníase sob diferentes aspectos (Tratamento de ADRs, falha do tratamento, ocorrência de anemia hemolítica, farmacogenética no tratamento das reações hansênicas).

9. Relevância do estudo

Contribuir com dados representativos do perfil de resposta ao tratamento da hanseníase em diferentes estados e municípios do Brasil;

Contribuir com a descrição dos diferentes tipos de ADRs observadas pela intolerância a dapsona nos estados analisados, bem como as frequências das mesmas;

Contribuir para um melhor planejamento da aquisição dos medicamentos distribuídos pelo SUS para o tratamento da hanseníase e das ADRs induzidas pela DDS;

Demonstrar de forma inédita a importância de uma avaliação genética prévia ao tratamento em relação aos seguintes tópicos:

→ diminuição das taxas de abandono em decorrência de intolerância ao tratamento e da possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana;

→ redução de gastos públicos com o tratamento das ADRs pela identificação dos grupos merecedores de atenção e posologias diferenciadas;

→ aumento da eficácia e segurança do tratamento da hanseníase e melhoria da qualidade de vida do paciente.

**10- Bibliografia**

1. Agúndez JA, Olivera M, Martínez C, Ladero JM, Benítez J. Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gene in a white population. *Pharmacogenetics*. outubro de 1996;6(5):423–8.
2. Agúndez JAG, Golka K, Martínez C, Selinski S, Blaszkewicz M, García-Martín E. Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. *Clin Chem*. agosto de 2008;54(8):1390–4.
3. Ahmad RA, Rogers HJ. Pharmacokinetics and protein binding interactions of dapsone and pyrimethamine. *Br J Clin Pharmacol*. novembro de 1980;10(5):519–24.
4. Ahrens EM, Meckler RJ, Callen JP. Dapsone-induced peripheral neuropathy. *Int J Dermatol*. junho de 1986;25(5):314–6.
5. Aït Moussa L, Khassouani CE, Hüe B, Jana M, Bégaud B, Soulaymani R. Determination of the acetylator phenotype in Moroccan tuberculosis patients using isoniazid as metabolic probe. *Int J Clin Pharmacol Ther*. dezembro de 2002;40(12):548–53.
6. Almeida S, Zandoná MR, Franken N, Callegari-Jacques SM, Osório-Wender MC, Hutz MH. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(6):346–51.
7. Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J Biol Chem*. 25 de junho de 1989;264(18):10388–95.
8. Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in a Turkish population. *Pharmacogenetics*. agosto de 1997;7(4):327–31.



9. Balakrishnan S, Karthikeyan S, Ramu G. Investigations into the haemolytic effects of dapsone therapy in leprosy patients. *Indian J Lepr.* janeiro de 1989;61(1):10–6.
10. Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* setembro de 1999;66(3):288–94.
11. Baohong Ji., Evelyne G. Perrani., Corinne Petinom and Jacques H. Grosset. 1996. Bactericidal Activities of Combinations of New Drugs against *Mycobacterium leprae* in Nude Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb. 1996, 393–399
12. Barranco VP. Dapsone--other indications. *Int J Dermatol.* novembro de 1982;21(9):513–4.
13. Beckett AH, Navas GE, Hutt AJ, Farag M. Disappearing N-hydroxy compounds. *J Pharm Pharmacol.* julho de 1979;31(7):476–7.
14. Beiguelman B, Pinto W, El-Guindy MM, Krieger H. Factors influencing the level of dapsone in blood. *Bull World Health Organ.* 1974;51(5):467–71.
15. Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, et al. Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis.* agosto de 1993;14(8):1689–92.
16. Behnoosh Amirmani, Amy H. Walker, Barbara L. Weber and Timothy R. Rebbeck. Response: re: Modification of Clinical Presentation of Prostate Tumors by a Novel Genetic Variant in CYP3A4. *JNCI J Natl Cancer Inst* (1999) 91 (18): 1588-1590. doi:10.1093/jnci/91.18.1588v
17. Benichou C, Eliaszewicz M, Flahault A. Adverse drug reactions in HIV-seropositive patients. In *adverse drug reactions A practical guide to diagnosis and management to diagnosis and management.* First Edition, ed Benichou C. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1994: 207.
18. Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet.* março de 1997;32(3):210–58.



19. Bluhm RE, Adedoyin A, McCarver DG, Branch RA. Development of dapsone toxicity in patients with inflammatory dermatoses: activity of acetylation and hydroxylation of dapsone as risk factors. *Clin Pharmacol Ther.* junho de 1999;65(6):598–605.
20. Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim M, Meyer UA. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 de junho de 1991;88(12):5237–41.
21. Bocquet H, Bagot M, Roujeau JC. Drug-induced pseudolymphoma and drug hypersensitivity syndrome (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms: DRESS). *Semin Cutan Med Surg.* dezembro de 1996;15(4):250–7.
22. Boukouvala S, Sim E. Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* maio de 2005;96(5):343–51.
23. Burk O, Koch I, Raucy J, Hustert E, Eichelbaum M, Brockmöller J, et al. The induction of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the human liver and intestine is mediated by the xenobiotic sensors pregnane X receptor (PXR) and constitutively activated receptor (CAR). *J Biol Chem.* 10 de setembro de 2004;279(37):38379–85.
24. Buttle G, Stephenson D, Smith S, *et al.* The treatment of streptococcal infections in mice with 4,4'-diamino-diphenylsulfone. *Lancet* 1937; 1:1331-4.
25. Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:27–42.
26. Carrière V, Berthou F, Baird S, Belloc C, Beaune P, de Waziers I. Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics.* junho de 1996;6(3):203–11.
27. Cascorbi I, Brockmöller J, Mrozkiewicz PM, Müller A, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase activity in man. *Drug Metab Rev.* maio de 1999;31(2):489–502.
28. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmöller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet.* setembro de



- 1995;57(3):581–92.
29. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmöller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet.* setembro de 1995;57(3):581–92.
30. Cascorbi I, Roots I. Pitfalls in N-acetyltransferase 2 genotyping. *Pharmacogenetics.* fevereiro de 1999;9(1):123–7.
31. Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V. CYP3A4*1B and NAT2*14 alleles in a native African population. *Clin Chem Lab Med.* abril de 2003;41(4):606–9.
32. Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD. Detection of MboII polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Chem.* fevereiro de 2001;47(2):348–51.
33. Chen B, Zhang W-X, Cai W-M. The influence of various genotypes on the metabolic activity of NAT2 in a Chinese population. *Eur J Clin Pharmacol.* maio de 2006;62(5):355–9.
34. Cho H-J, Koh W-J, Ryu Y-J, Ki C-S, Nam M-H, Kim J-W, et al. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* novembro de 2007;87(6):551–6.
35. Chou FC, Tzeng SJ, Huang JD. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese. *Drug Metab Dispos.* setembro de 2001;29(9):1205–9.
36. Cochrane R, Ramanujam H, Paul H, *et al.*, Two and a half years experimental work on the sulfone grupo f drugs. *Lepr Rev* 1949; 20:4-64.
37. Coleman MD, Breckenridge AM, Park BK. Bioactivation of dapsona to a cytotoxic metabolite by human hepatic microsomal enzymes. *Br J Clin Pharmacol.* outubro de 1989;28(4):389–95.
38. Coleman MD, Russell RM, Tingle MD, Park BK. Inhibition of dapsona-induced methaemoglobinaemia by cimetidine in the presence of trimethoprim in the rat. *J Pharm Pharmacol.* fevereiro de 1992;44(2):114–8.



39. Coleman MD. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. *Br J Dermatol.* novembro de 1993;129(5):507–13.
40. Coleman MD. Dapsone toxicity: some current perspectives. *Gen Pharmacol.* novembro de 1995;26(7):1461–7.
41. Coura JR et al. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 2005.
42. Cowdry EV. Cytological studies on globi in leprosy. *Am J Pathol.* março de 1940;16(2):103–36.9.
43. Cowdry E & Ruangsiri C. Influence of promin, starch and hepataldehyde on experimental leprosy in rats. *Arch Pathol* 1940; 32:632-40.
44. Crettol S, Petrovic N, Murray M. Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr Pharm Des.* 2010;16(2):204–19.
45. Criado PR, Criado RFJ, Vasconcellos C, Ramos RO, Gonçalves AC. Reações Cutâneas graves adversas a drogas- Aspectos relevantes ao diagnóstico e ao tratamento- Parte II. *Na Brás Dermatol*, Rio de Janeiro, 2004 79(5):587-601.
46. Criado PR, Lucena SK, Crivellaro APGS, Criado RFJ, Tebcherani A, Nogueira AT *et al.* Síndrome de hipersensibilidade a anticonvulsivantes: relato de dois casos. *Rev. Bras. Clin Terap* 2002; 28:59-63.
47. Crook PR, Hortas C, Roberts EJ, Swinson DR, Mucklow JC, Shadforth MF. Acetylator phenotype and the effect of dapsone in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* outubro de 1983;10(5):805–8.
48. Crook T, Raskin A, Davis D. Factors associated with attempted suicide among hospitalized depressed patients. *Psychol Med.* novembro de 1975;5(4):381–8.
49. Cucinell SA, Israili ZH, Dayton PG. Microsomal N-oxidation of dapsone as a cause of methemoglobin formation in human red cells. *Am J Trop Med Hyg.* maio de 1972;21(3):322–31.



50. Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther.* dezembro de 2001;299(3):825–31.
51. Dalhoff K, Buus Jensen K, Enghusen Poulsen H. Cancer and molecular biomarkers of phase 2. *Meth Enzymol.* 2005;400:618–27.
52. Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol.* fevereiro de 2003;17(1):27–41.
53. Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(1):13–31.
54. Dandara C, Masimirembwa CM, Magimba A, Kaaya S, Sayi J, Sommers DK, et al. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in Africans: the identification of a new allele with nucleotide changes 481C>T and 590G>A. *Pharmacogenetics.* janeiro de 2003;13(1):55–8.
55. DeGowin RL. A review of therapeutic and hemolytic effects of dapsone. *Arch Intern Med.* agosto de 1967;120(2):242–8.
56. Deloménie C, Sica L, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM. Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2*) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics.* abril de 1996;6(2):177–85.
57. Dogmack G. Ein beitrage zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *Dtsch Med Wochenschr* 1935; 61:250-3.
58. Drayer DE, Reidenberg MM. Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. *Clin Pharmacol Ther.* setembro de 1977;22(3):251–8.
59. Duhra P, Charles-Holmes R. Linear IgA disease with haemorrhagic pompholyx and dapsone-induced neutropenia. *Br J Dermatol.* agosto de 1991;125(2):172–4.
60. Edstein MD, Veenendaal JR, Newman K, Hyslop R. Excretion of chloroquine, dapsone and pyrimethamine in human milk. *Br J Clin Pharmacol.* dezembro de 1986;22(6):733–5.



61. Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, et al. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics*. julho de 2001;11(5):447–58.
62. Elshourbagy NA, Guzelian PS. Separation, purification, and characterization of a novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone-16 alpha-carbonitrile. *J Biol Chem*. 1980 Feb 25;255(4):1279-85.
63. Evans DA. N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther*. 1989;42(2):157–234.
64. Faget G, Pogge R, Johansen F, *et al.*, The promin treatment of leprosy. *Pub Health Rep* 1943; 58:1729-41.
65. Fine JD, Katz SI, Donahue MJ, Hendricks AA. Psychiatric reaction to dapsone and sulfapyridine. *J Am Acad Dermatol*. agosto de 1983;9(2):274–5.
66. Feldman W, Hinshaw H, Moses H. Effect of promin (sodium salt of p-p'-diaminodiphenyl-sulfone-N'-didextrose sulfate) on experimental tuberculosis: preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clinic* 1940;15:695-9.
67. Fleming CM, Branch RA, Wilkinson GR, Guengerich FP. Human liver microsomal N-hydroxylation of dapsone by cytochrome P-4503A4. *Mol Pharmacol*. maio de 1992;41(5):975–80.
68. Fourneau E, Trifouel J, Nitti F *et al.* Action anti-streptococcique des derives sulfures organiques. *Compt Render Acad Sci* 1937; 204:1763-6.
69. Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW. Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics*. abril de 2001;11(3):207–15.
70. Friman G, Nyström-Rosander C, Jonsell G, Björkman A, Lekås G, Svendsrup B. Agranulocytosis associated with malaria prophylaxis with Maloprim. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 16 de abril de 1983;286(6373):1244–5.
71. Fromm E, Wittmann J. Derivate des p-nitrophenols. *Berichte Dotsch Chem Ges* 1908; 41:2264-73
72. Fukuen S, Fukuda T, Maune H, Ikenaga Y, Yamamoto I, Inaba T, et al. Novel



- detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5*3 and *6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics*. junho de 2002;12(4):331–4.
73. García-Martín E, Martínez C, Pizarro RM, García-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, et al. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther*. março de 2002;71(3):196–204.
74. Garsa AA, McLeod HL, Marsh S. CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by Pyrosequencing. *BMC Med Genet*. 9 de maio de 2005;6:19.
75. Gashaw I, Kirchheiner J, Goldammer M, Bauer S, Seidemann J, Zoller K, et al. Cytochrome p450 3A4 messenger ribonucleic acid induction by rifampin in human peripheral blood mononuclear cells: correlation with alprazolam pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. novembro de 2003;74(5):448–57.
76. Gatti G, Loy A, Lorusso C, Rossi G, Bassetti D. Penetration of dapsone into lung of human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J*. maio de 1997;16(5):523–4.
77. Gelber R, Peters JH, Gordon GR, Glazko AJ, Levy L. The polymorphic acetylation of dapsone in man. *Clin Pharmacol Ther*. abril de 1971;12(2):225–38.
78. Gill HJ, Tingle MD, Park BK. N-Hydroxylation of dapsone by multiple enzymes of cytochrome P450: implications for inhibition of haemotoxicity. *Br J Clin Pharmacol*. dezembro de 1995;40(6):531–8.
79. Glazko AJ, Chang T, Baukema J, Dill WA, Goulet JR, Buchanan RA. Metabolic disposition of diphenylhydantoin in normal human subjects following intravenous administration. *Clin Pharmacol Ther*. agosto de 1969;10(4):498–504.
80. Gonzalez FJ, Schmid BJ, Umeno M, McBride OW, Hardwick JP, Meyer UA, et al. Human P450PCN1: sequence, chromosome localization, and direct evidence through cDNA expression that P450PCN1 is nifedipine oxidase. *DNA*. março de 1988;7(2):79–86.
81. Graham WR. Adverse effects of dapsone. *Int J Dermatol*. setembro de 1975;14(7):494–500.



82. Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A, et al. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat Res.* 12 de maio de 1997;376(1-2):61–70.
83. Grindulis KA, McConkey B. Rheumatoid arthritis: the effects of treatment with dapsone on hemoglobin. *J Rheumatol.* dezembro de 1984;11(6):776–8.
84. Grossman SJ, Jollow DJ. Role of dapsone hydroxylamine in dapsone-induced hemolytic anemia. *J Pharmacol Exp Ther.* janeiro de 1988;244(1):118–25.
85. Guengerich FP. Molecular advances for the cytochrome P-450 superfamily. *Trends Pharmacol Sci.* agosto de 1991;12(8):281–3.
86. Guengerich FP. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv Pharmacol.* 1997;43:7–35.
87. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:1–17.
88. Guo R, Thormann W, Lauterberg B. Relationship between high incidence of adverse dapsone reactions and slow acetylate phenotype or low plasma/lymphocyte glutathione level. *Chin Med J.* dezembro de 1996;109(12):933–6.
89. Gupta VH, Amarapurkar DN, Singh M, Sasi P, Joshi JM, Baijal R, et al. Association of N-acetyltransferase 2 and cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Western India. *J Gastroenterol Hepatol.* agosto de 2013;28(8):1368–74.
90. Gurney H. I don't underdose my patients...do I? *Lancet Oncol.* setembro de 2005;6(9):637–8.
91. Gutmann L, Martin JD, Welton W. Dapsone motor neuropathy--an axonal disease. *Neurology.* junho de 1976;26(6 PT 1):514–6.
92. Hamzeiy H, Vahdati-Mashhadian N, Edwards HJ, Goldfarb PS. Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. *Mutat Res.* 20 de março de 2002;500(1-2):103–10.



93. Hanson A, Melander A, Wåhlin-Boll E. Acetylator phenotyping: a comparison of the isoniazid and dapsona tests. *Eur J Clin Pharmacol.* 1981;20(3):233–4.
94. Hardman FG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddom RW, Goodman AG, Goodman and Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics.* 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 1996.
95. Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2002 set 30;506-507:65-77.
96. Hein DW, Doll MA. Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenomics.* janeiro de 2012;13(1):31–41.
97. Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res.* 30 de setembro de 2002;506-507:65–77.
98. Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, et al. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* janeiro de 2000;9(1):29–42.
99. Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy SI, Kishikawa Y, et al. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *Eur J Clin Pharmacol.* setembro de 2002;58(6):417–21.
100. Hjelm M, de Verdier CH. Biochemical effects of aromatic amines. I. Methaemoglobinaemia, haemolysis and Heinz-body formation induced by 4,4'-diaminodiphenylsulphone. *Biochem Pharmacol.* julho de 1965;14(7):1119–28.
101. Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos.* março de 2001;29(3):268–73.
102. Huang Y-S, Chern H-D, Su W-J, Wu J-C, Chang S-C, Chiang C-H, et al. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology.* abril de 2003;37(4):924–30.
103. Huang Y-S, Chern H-D, Su W-J, Wu J-C, Lai S-L, Yang S-Y, et al. Polymorphism



- of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*. abril de 2002;35(4):883–9.
104. Hug H, Bagatto D, Dannecker R, Schindler R, Horlacher O, Gut J. ADRIS--The Adverse Drug Reactions Information Scheme. *Pharmacogenetics*. dezembro de 2003;13(12):767–72.
105. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. dezembro de 2001;11(9):773–9.
106. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med*. setembro de 2001a;250(3):186–200.
107. Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res*. 1 de outubro de 2001b;482(1-2):11–9.
108. Ingelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Aug 29; 360(1460):1563-70.
109. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. dezembro de 2007;116(3):496–526.
110. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. dezembro de 2007;116(3):496–526.
111. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci*. abril de 2004;25(4):193–200.
112. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*.



- 27 de outubro de 2005;437(7063):1299–320.
113. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001. 409:860-921.
114. Israili ZH, Cucinell SA, Vaught J, Davis E, Lesser JM, Dayton PG. Studies of the metabolism of dapsone in man and experimental animals: formation of N-hydroxy metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* outubro de 1973;187(1):138–51.
115. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev.* maio de 2001;33(2):161–235.
116. Iyer L, Ratain MJ. Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. *Eur J Cancer.* setembro de 1998;34(10):1493–9.
117. Jamrozik K. Dapsone syndrome occurring in two brothers. *Lepr Rev.* março de 1986;57(1):57–62.
118. Jollow DJ, Bradshaw TP, McMillan DC. Dapsone-induced hemolytic anemia. *Drug Metab Rev.* 1995;27(1-2):107–24.
119. Jopling WH. Side-effects of antileprosy drugs in common use. *Lepr Rev.* dezembro de 1983;54(4):261–70.
120. Jorge-Nebert LF, Eichelbaum M, Griese E-U, Inaba T, Arias TD. Analysis of six SNPs of NAT2 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and determination of the Embera acetylation phenotype using caffeine. *Pharmacogenetics.* janeiro de 2002;12(1):39–48.
121. Jounaïdi Y, Hyrailles V, Gervot L, Maurel P. Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? *Biochem Biophys Res Commun.* 16 de abril de 1996;221(2):466–70.
122. Kadlubar F. The putative high activity variant CYP3A4*1B, predicts the onset of puberty in young girls. *Proc. AACR* 2001; 42:2198.
123. Kalra BS. Cytochrome P450 enzyme isoforms and their therapeutic implications: an update. *Indian J Med Sci.* fevereiro de 2007;61(2):102–16.



124. Karim AK, Elfellah MS, Evans DA. Human acetylator polymorphism: estimate of allele frequency in Libya and details of global distribution. *J Med Genet.* outubro de 1981;18(5):325–30.
125. Kelsell DP, Wolf CR, Spurr NK. An XmnI RFLP detected with a probe for the CYP2E gene locus on chromosome 10. *Nucleic Acids Res.* 25 de maio de 1990;18(10):3111.
126. Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, et al. Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry.* 24 de março de 1998;37(12):4137–47.
127. Kramer PA, Glader BE, Li TK. Mechanism of methemoglobin formation by diphenylsulfones. Effect of 4-amino-4'-hydroxyaminodiphenylsulfone and other p-substituted derivatives. *Biochem Pharmacol.* 1 de maio de 1972;21(9):1265–74.
128. Kudzi W, Dodoo ANO, Mills JJ. Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans? *BMC Med Genet.* 2010;11:111.
129. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* abril de 2001;27(4):383–91.
130. Kukongviriyapan V, Prawan A, Tassaneyakul W, Aiemsa-Ard J, Warasiha B. Arylamine N-acetyltransferase-2 genotypes in the Thai population. *Br J Clin Pharmacol.* março de 2003;55(3):278–81.
131. Kumano K, Tani M, Murata Y. Dapsone in the treatment of miliary lupus of the face. *Br J Dermatol.* julho de 1983;109(1):57–62.
132. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 18 de novembro de 2002;54(10):1271–94.
133. Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, et al. Common



- allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics*. março de 2002;12(2):121–32.
134. Lammintausta K, Kangas L, Lammintausta R. The pharmacokinetics of dapsone and acetylated dapsone in serum and saliva. *Int J Clin Pharmacol Biopharm*. abril de 1979;17(4):159–63.
135. Lang PG. Sulfones and sulfonamides in dermatology today. *J Am Acad Dermatol*. dezembro de 1979;1(6):479–92.
136. Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Semin Liver Dis*. 2002;22(2):145–55.
137. Lee BL, Medina I, Benowitz NL, Jacob P, Wofsy CB, Mills J. Dapsone, trimethoprim, and sulfamethoxazole plasma levels during treatment of *Pneumocystis pneumonia* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Evidence of drug interactions. *Ann Intern Med*. 15 de abril de 1989;110(8):606–11.
138. Leoung GS, Mills J, Hopewell PC, Hughes W, Wofsy C. Dapsone-trimethoprim for *Pneumocystis carinii pneumonia* in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*. julho de 1986;105(1):45–8.
139. Leta GC, Simas MEPA, Santos D, Oliveira MLW, Gomes MK. Dapsone hypersensitivity syndrome: a systematic review of criteria. *Hansen Int (on line)* 2003 vol 28 no 1 Bauru
140. Lewis DFV. *Guide to cytochromes P450-structure and function*. London: Taylor & Francis (2001)
141. Li D, Zhang G-L, Lou Y-Q, Li Q, Wang X, Bu X-Y. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A5 and MDR1 haplotype in mainland Chinese Han, Uygur and Kazakh ethnic groups. *J Clin Pharm Ther*. fevereiro de 2007;32(1):89–95.
142. Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S. Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, blacks, Hispanics, and whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet*. abril de 1993;52(4):827–34.
143. Lin HJ, Probst-Hensch NM, Hughes NC, Sakamoto GT, Louie AD, Kau IH, et al.



- Variants of N-acetyltransferase NAT1 and a case-control study of colorectal adenomas. *Pharmacogenetics*. junho de 1998;8(3):269–81.
144. Liu C-H, Peck K, Huang J-D, Lin M-S, Wang C-H, Hsu W-P, et al. Screening CYP3A single nucleotide polymorphisms in a Han Chinese population with a genotyping chip. *Pharmacogenomics*. outubro de 2005;6(7):731–47.
145. Liu L, Yang L, Zhang Y-C, Ai X-F, Wang J-X, Xiao Z-J. [Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes genes in a Han Chinese population]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 20 de outubro de 2009;89(38):2675–81.
146. Lorenz M, Wozel G, Schmitt J. Hypersensitivity reactions to dapsone: a systematic review. *Acta Derm Venereol*. março de 2012;92(2):194–9.
147. Lundkvist J, Jönsson B. Pharmacoeconomics of adverse drug reactions. *Fundam Clin Pharmacol*. junho de 2004;18(3):275–80.
148. Mahmud R, Tingle MD, Maggs JL, Cronin MT, Dearden JC, Park BK. Structural basis for the haemotoxicity of dapsone: the importance of the sulphonyl group. *Toxicology*. 14 de fevereiro de 1997;117(1):1–11.
149. Manfredi G, De Panfilis G, Zampetti M, Allegra F. Studies on dapsone induced haemolytic anaemia. I. Methaemoglobin production and G-6-PD activity in correlation with dapsone dosage. *Br J Dermatol*. abril de 1979;100(4):427–32.
150. Martin MA, Cox PH, Beck K, Styer CM, Beall GN. A comparison of the effectiveness of three regimens in the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients. *Arch Intern Med*. março de 1992;152(3):523–8.
151. McBride OW, Umeno M, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A Taq I polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E). *Nucleic Acids Res*. 10 de dezembro de 1987;15(23):10071.
152. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:269–96.
153. Minchin RF, Hanna PE, Dupret J-M, Wagner CR, Rodrigues-Lima F, Butcher NJ.



- Arylamine N-acetyltransferase I. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):1999–2005.
154. Mitra AK, Thummel KE, Kalhorn TF, Kharasch ED, Unadkat JD, Slattery JT. Metabolism of dapsone to its hydroxylamine by CYP2E1 in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther.* novembro de 1995;58(5):556–66.
155. Mortensen HM, Froment A, Lema G, Bodo J-M, Ibrahim M, Nyambo TB, et al. Characterization of genetic variation and natural selection at the arylamine N-acetyltransferase genes in global human populations. *Pharmacogenomics.* novembro de 2011;12(11):1545–58.
156. Mrozikiewicz PM, Cascorbi I, Brockmöller J, Roots I. Determination and allelic allocation of seven nucleotide transitions within the arylamine N-acetyltransferase gene in the Polish population. *Clin Pharmacol Ther.* abril de 1996;59(4):376–82.
157. Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet.* setembro de 2004;75(3):353–62.
158. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 12 de outubro de 2002;360(9340):1155–62.
159. Nebert DW. Proposal for an allele nomenclature system based on the evolutionary divergence of haplotypes. *Hum Mutat.* dezembro de 2002;20(6):463–72.
160. Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet.* fevereiro de 1997;60(2):265–71.
161. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* fevereiro de 1996;6(1):1–42.
162. Neuhaus T, Ko Y-D, Lorenzen K, Fronhoffs S, Harth V, Bröde P, et al. Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. *Toxicol Lett.* 15 de junho de 2004;151(1):273–82.
163. Oliveira E, Marsh S, van Booven DJ, Amorim A, Prata MJ, McLeod HL. Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. *Pharmacogenomics.* julho de 2007;8(7):703–12.



164. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 “pie”. *Drug Metab Dispos.* maio de 2006;34(5):880–6.
165. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* dezembro de 1997;283(3):1552–62.
166. Paniker U, Levine N. Dapsone and sulfapyridine. *Dermatol Clin.* janeiro de 2001;19(1):79–86, viii.
167. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* outubro de 1999;8(10):901–5.
168. Park KW, Kang J, Park JJ, Yang H-M, Lee H-Y, Kang H-J, et al. Amlodipine, clopidogrel and CYP3A5 genetic variability: effects on platelet reactivity and clinical outcomes after percutaneous coronary intervention. *Heart.* setembro de 2012;98(18):1366–72.
169. Park SY, Kang YS, Jeong MS, Yoon HK, Han KO. Frequencies of CYP3A5 genotypes and haplotypes in a Korean population. *J Clin Pharm Ther.* fevereiro de 2008;33(1):61–5.
170. Parkin DP, Vandenplas S, Botha FJ, Vandenplas ML, Seifart HI, van Helden PD, et al. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* maio de 1997;155(5):1717–22.
171. Paxton JW, Briant RH. Alpha 1-acid glycoprotein concentrations and propranolol binding in elderly patients with acute illness. *Br J Clin Pharmacol.* novembro de 1984;18(5):806–10.
172. Pertel P, Hirschtick R. Adverse reactions to dapsone in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* abril de 1994;18(4):630–2.
173. Peters JH, Gordon GR, Ghouh DC, Tolentino JG, Walsh GP, Levy L. The disposition of the antileprotic drug dapsone (DDS) in Philippine subjects. *Am J Trop Med Hyg.*



julho de 1972;21(4):450–7.

174. Peters JH, Gordon GR, Murray JF, Fieldsteel AH, Levy L. Minimal inhibitory concentration of dapsone for *Mycobacterium leprae* in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* novembro de 1975;8(5):551–7. (A)
175. Peters JH, Gordon GR, Karat AB. Polymorphic acetylation of the antibacterials, sulfamethazine and dapsone, in South Indian subjects. *Am J Trop Med Hyg.* julho de 1975;24(4):641–8. (B)
176. Peters JH, Murray JF, Gordon GR. The disposition of sulfoxone and solasulfone in leprosy patients. *Lepr Rev.* setembro de 1975;46(3):171–80.(C)
177. Petros W. Associations between variants in several drug metabolism genes and chemotherapy pharmacokinetics and clinical response. *Proc. AACR 2001*; 42:1435
178. Pieters FA, Zuidema J. The pharmacokinetics of dapsone after oral administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* outubro de 1986;22(4):491–4.
179. Portaels F, Fissette K, De Ridder K, Macedo PM, De Muynck A, Silva MT. Effects of freezing and thawing on the viability and the ultrastructure of in vivo grown mycobacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* dezembro de 1988;56(4):580–7.
180. Possuelo LG, Castelan JA, de Brito TC, Ribeiro AW, Cafrune PI, Picon PD, et al. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur J Clin Pharmacol.* julho de 2008;64(7):673–81.
181. Poulsen A, Hultberg B, Thomsen K, Wantzin GL. Regression of Kaposi's sarcoma in AIDS after treatment with dapsone. *Lancet.* 10 de março de 1984;1(8376):560.
182. Powell H, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Smith DA, Park BK. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype. *Pharmacogenetics.* outubro de 1998;8(5):411–21.
183. Powell RD, DeGowin RL, Eppes RB, McNamara JV, Carson PE. The antimalarial and hemolytic properties of 4,4-diaminodiphenyl sulfone (DDS). *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* dezembro de 1967;35(4):590–604.



184. Prows CA, Prows DR. Medication selection by genotype: How genetics is changing drug prescribing and efficacy. *Am J Nurs.* maio de 2004;104(5):60–70; quiz 71.
185. Queiroz RH, Souza AM, Melchior E, Gouveia EG, Carvalho D. Influence of acetylator phenotype on the haematological and biochemical effects associated with dapsone in leprosy patients. *Lepr Rev.* setembro de 1997;68(3):212–7.
186. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst.* 19 de agosto de 1998;90(16):1225–9.
187. Rees RS, Altenbern DP, Lynch JB, King LE. Brown recluse spider bites. A comparison of early surgical excision versus dapsone and delayed surgical excision. *Ann Surg.* novembro de 1985;202(5):659–63.
188. Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev.* abril de 1962;33:119–28.
189. Rihs H-P, John A, Scherenberg M, Seidel A, Brüning T. Concordance between the deduced acetylation status generated by high-speed: real-time PCR based NAT2 genotyping of seven single nucleotide polymorphisms and human NAT2 phenotypes determined by a caffeine assay. *Clin Chim Acta.* fevereiro de 2007;376(1-2):240–3.
190. Riley RJ, Roberts P, Coleman MD, Kitteringham NR, Park BK. Bioactivation of dapsone to a cytotoxic metabolite: in vitro use of a novel two compartment system which contains human tissues. *Br J Clin Pharmacol.* setembro de 1990;30(3):417–26.
191. Roemer HC, Weistenhofer W, Lohlein D, Geller F, Blomeke B, Golka K. N-acetyltransferase 1 in colon and rectal cancer cases from an industrialized area. *J Toxicol Environ Health Part A.* 2008;71(13-14):902–5.
192. Roses AD. Pharmacogenetics place in modern medical science and practice. *Life Sci.* 15 de fevereiro de 2002;70(13):1471–80.
193. Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N Engl J Med.* 10 de novembro de 1994;331(19):1272–85.
194. Roy B, Chowdhury A, Kundu S, Santra A, Dey B, Chakraborty M, et al. Increased



- risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 “null” mutation. *J Gastroenterol Hepatol.* setembro de 2001;16(9):1033–7.
195. Roy B, Ghosh SK, Sutradhar D, Sikdar N, Mazumder S, Barman S. Predisposition of antituberculosis drug induced hepatotoxicity by cytochrome P450 2E1 genotype and haplotype in pediatric patients. *J Gastroenterol Hepatol.* abril de 2006;21(4):784–6.
196. Roy PD, Majumder M, Roy B. Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics.* março de 2008;9(3):311–21.
197. Sabbagh A, Darlu P, Crouau-Roy B, Poloni ES. Arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic diversity and traditional subsistence: a worldwide population survey. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e18507.
198. Sabbagh A, Darlu P. SNP selection at the NAT2 locus for an accurate prediction of the acetylation phenotype. *Genet Med.* fevereiro de 2006;8(2):76–85.
199. Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gérard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES. Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. *BMC Genet.* 2008;9:21.
200. Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther.* janeiro de 2000;67(1):48–56.
201. Schuetz JD, Molowa DT, Guzelian PS. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys.* 1 de novembro de 1989;274(2):355–65.
202. Scott GL, Rasbridge MR. The in vitro action of dapsone and its derivatives on normal and G6PD-deficient red cells. *Br J Haematol.* março de 1973;24(3):307–17.
203. Sekine A, Saito S, Iida A, Mitsunobu Y, Higuchi S, Harigae S, et al. Identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of human N-acetyltransferase genes NAT1, NAT2, AANAT, ARD1 and L1CAM in the Japanese population. *J Hum Genet.*



- 2001;46(6):314–9.
204. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* julho de 1994;270(1):414–23.
205. Shimizu Y, Dobashi K, Mita Y, Endou K, Moriya S, Osano K, et al. DNA microarray genotyping of N-acetyltransferase 2 polymorphism using carbodiimide as the linker for assessment of isoniazid hepatotoxicity. *Tuberculosis (Edinb).* setembro de 2006;86(5):374–81.
206. Sim E, Payton M, Noble M, Minchin R. An update on genetic, structural and functional studies of arylamine N-acetyltransferases in eucaryotes and procaryotes. *Hum Mol Genet.* outubro de 2000;9(16):2435–41.
207. Sim E, Westwood I, Fullam E. Arylamine N-acetyltransferases. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* abril de 2007;3(2):169–84.
208. Singla N, Gupta D, Birbian N, Singh J. Association of NAT2, GST and CYP2E1 polymorphisms and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Tuberculosis (Edinb).* maio de 2014;94(3):293–8.
209. Smith WC. Are hypersensitivity reactions to dapsone becoming more frequent? *Lepr Rev.* março de 1988;59(1):53–8.
210. Sneddon IB, Wilkinson DS. Subcorneal pustular dermatosis. *Br J Dermatol.* dezembro de 1956;68(12):385–94.
211. Spielberg SP. N-acetyltransferases: pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm.* outubro de 1996;24(5):509–19.
212. Spinasse LB, Santos AR, Suffys PN, Muxfeldt ES, Salles GF. Different phenotypes of the NAT2 gene influences hydralazine antihypertensive response in patients with resistant hypertension. *Pharmacogenomics.* fevereiro de 2014;15(2):169–78.
213. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype



- reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* abril de 2001;68(4):978–89.
214. Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* novembro de 2003;73(5):1162–9.
215. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet.* março de 2005;76(3):449–62.
216. Stone SP, Goodwin RM. Dapsone-induced jaundice. *Arch Dermatol.* junho de 1978;114(6):947.
217. Swain AF, Ahmad RA, Rogers HJ, Leonard JN, Fry L. Pharmacokinetic observations on dapsone in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol.* janeiro de 1983;108(1):91–8.
218. Tayeb MT, Clark C, Sharp L, Haites NE, Rooney PH, Murray GI, et al. CYP3A4 promoter variant is associated with prostate cancer risk in men with benign prostate hyperplasia. *Oncol Rep.* junho de 2002;9(3):653–5.
219. Teixeira RLF, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQP, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, et al. Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutat Res.* 1 de novembro de 2007;624(1-2):31–40.
220. Teixeira RLF, Silva FP, Silveira AR, Cabello PH, Mendonça-Lima L, Rabahi MF, et al. Sequence analysis of NAT2 gene in Brazilians: identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. *Mutat Res.* 5 de janeiro de 2010;683(1-2):43–9.
221. Teixeira RL de F, Morato RG, Cabello PH, Muniz LMK, Moreira A da SR, Kritski AL, et al. Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* setembro de 2011;106(6):716–24.
222. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human



- CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:389–430.
223. Tingle MD, Blue MAB, Coleman MD and Park BK. The use of a novel three compartment system to investigate cell selective drug toxicity in vitro. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1992; 33, 216P-217P.
224. Tingle MD, Coleman MD, Park BK. An investigation of the role of metabolism in dapsone-induced methaemoglobinaemia using a two compartment in vitro test system. *Br J Clin Pharmacol.* dezembro de 1990;30(6):829–38.
225. Uehleke H. N-hydroxylation. *Xenobiotica.* outubro de 1971;1(4):327–38.
226. Uematsu F, Kikuchi H, Ohmachi T, Sagami I, Motomiya M, Kamataki T, Komori M, Watanabe M. 29. Two common RFLPs of the human CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.* 1991 May 25;19(10):2803.
227. Uetrecht J, Zahid N, Shear NH, Biggar WD. Metabolism of dapsone to a hydroxylamine by human neutrophils and mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 4 de janeiro de 1988;245(1):274–9.
228. Uetrecht JP. The role of leukocyte-generated reactive metabolites in the pathogenesis of idiosyncratic drug reactions. *Drug Metab Rev.* 1992;24(3):299–366.
229. Umamaheswaran G, Kumar DK, Adithan C. Distribution of genetic polymorphisms of genes encoding drug metabolizing enzymes & drug transporters - a review with Indian perspective. *Indian J Med Res.* janeiro de 2014;139(1):27–65.
230. Vage C, Saab N, Woster PM, Svensson CK. Dapsone-induced hematologic toxicity: comparison of the methemoglobin-forming ability of hydroxylamine metabolites of dapsone in rat and human blood. *Toxicol Appl Pharmacol.* dezembro de 1994;129(2):309–16.
231. Vage C, Svensson CK. Evidence that the biotransformation of dapsone and monoacetyldapsone to their respective hydroxylamine metabolites in rat liver microsomes is mediated by cytochrome P450 2C6/2C11 and 3A1. *Drug Metab Dispos.* agosto de 1994;22(4):572–7.
232. Venkatesan K. Clinical pharmacokinetic considerations in the treatment of patients



- with leprosy. *Clin Pharmacokinet.* junho de 1989;16(6):365–86.
233. Von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem.* junho de 2001;47(6):1048–52.
234. Vuilleumier N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, Mermillod B, et al. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur J Clin Pharmacol.* junho de 2006;62(6):423–9.
235. Walker AH, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, et al. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. *Mutations in brief no. 191.* Online. *Hum Mutat.* 1998;12(4):289.
236. Waller E and Goehrs H. Dapsone induced hemolytic anemia in a patient with relapsing polychondritis. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy.* 1980;14:412-414.
237. Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* julho de 2000;68(1):82–91.
238. Ward KE, McCarthy MW. Dapsone-induced methemoglobinemia. *Ann Pharmacother.* maio de 1998;32(5):549–53.
239. Watanabe J, Hayashi S, Kawajiri K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J Biochem.* agosto de 1994;116(2):321–6.
240. Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics.* agosto de 1994;4(4):171–84.
241. Weber WW, Hein DW. Clinical pharmacokinetics of isoniazid. *Clin Pharmacokinet.* dezembro de 1979;4(6):401–22.



242. Weber WW, Hein DW. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev.* março de 1985;37(1):25–79.
243. Weise M, Seydel JK, Pieper H, Kruger G, Noll KR, Keck J. Multiple regression analysis of antimalarial activities of sulphones and sulphonamides in cell-free systems and principal components analysis to compare with antibacterial activities. *Quant Struct-Acta Relat* 1987; 6:164-172.
244. Weistenhofer W, Blaszkewicz M, Bolt HM, Golka K. N-acetyltransferase-2 and medical history in bladder cancer cases with a suspected occupational disease (BK 1301) in Germany. *J Toxicol Environ Health Part A.* 2008;71(13-14):906–10.
245. Wen S, Wang H, Ding Y, Liang H, Wang S. Screening of 12 SNPs of CYP3A4 in a Chinese population using oligonucleotide microarray. *Genet Test.* 2004;8(4):411–6.
246. Wijnen P a. HM, Op den Buijsch R a. M, Drent M, Kuijpers PMJC, Kuipers PMJC, Neef C, et al. Review article: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther.* dezembro de 2007;26 Suppl 2:211–9.
247. Worebec SM. Current approaches and future directions in the treatment of leprosy. *Research and reports in tropical medicine.* 2012: 3 79-91.
248. Wozel G, Barth J. Current aspects of modes of action of dapsone. *Int J Dermatol.* outubro de 1988;27(8):547–52.
249. Wozel G. The story of sulfones in tropical medicine and dermatology. *Int J Dermatol.* fevereiro de 1989;28(1):17–21.
250. Wozel G & Goebel K. Hypersensitivity syndrome to dapsone-an epidemiological review. In: Ring J, Weindinger S, Darsow U, editors. *Skin and environment perception and protection.* Munich 10th EADV-congress, 2001:p105-110.
251. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLp3). *Mol Pharmacol.* agosto de 1990;38(2):207–13.
252. Xie HG, Xu ZH, Ou-Yang DS, Shu Y, Yang DL, Wang JS, et al. Meta-analysis of phenotype and genotype of NAT2 deficiency in Chinese populations.



- Pharmacogenetics. dezembro de 1997;7(6):503–14.
253. Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW. Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis*. agosto de 2007;28(8):1665–71.
254. Zang Y, Zhao S, Doll MA, States JC, Hein DW. Functional characterization of the A411T (L137F) and G364A (D122N) genetic polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Pharmacogenet Genomics*. janeiro de 2007;17(1):37–45.
255. Zhu YI, Stiller MJ. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *J Am Acad Dermatol*. setembro de 2001;45(3):420–34.
256. Zone JJ. Clinical spectrum, pathogenesis and treatment of linear IgA bullous dermatosis. *J Dermatol*. novembro de 2001;28(11):651–3.
257. Zuidema J, Hilbers-Modderman ES, Merkus FW. Clinical pharmacokinetics of dapsone. *Clin Pharmacokinet*. agosto de 1986;11(4):299–315.
258. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>. Acessado em 11 de fevereiro de 2015.
259. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>. Acessado em 11 de fevereiro de 2015.
260. Arylamine N-acetyltransferase Gene Nomenclature Commite: nat.mbg.duth.gr. Acessado em 11 de novembro de 2014.
261. DATASUS: <http://www2.datasus.gov.br>. Acessado em 11 de fevereiro de 2015.
262. Leprosy Today: <http://www.who.int/lep/en>. Acessado em 11 de fevereiro de 2015.
263. PUBMED – GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>. Acessado em 11 de fevereiro de 2015.
264. Primer3 software: bioinfo.nt.ee/primer3-0.4.01/ Acessado em 10 de fevereiro de 2015.

**11-ANEXOS****ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO PARA ENTREVISTA DOS PACIENTES (Controles)****Formulário para a coleta de dados (Controles)**

Projeto: “Avaliação dos fenótipos de acetilação predominantes nas populações de 5 macro regiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase”

Pesquisador Responsável: Dr. Adalberto Rezende Santos

Nome da Unidade de Saúde:

UF:

Nº Prontuário:

Nome:

Data do Nascimento:

Sexo ()

Escolaridade:

Ocupação

Endereço:

Telefone:

Nº de cômodos na casa:

Renda Familiar:

Nº de pessoas residentes:

Uso regular de álcool:

Em uso de medicamentos (listar):

Alergia (Especificar):

Convívio prévio com caso de hanseníase: S () N () NR ()

Tipo de contato: Pai () Mãe () Irmão () cônjuge ()

Parente consanguíneo ()

Parente não consanguíneo ()

Forma Clínica do Contato; PB () MB () NR ()

Data do Diagnóstico do contato:

Classificação do contato PB () MB ()



Forma Clínica do contato I () T () D () V () NC ()

Observações:

**ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO PARA ENTREVISTA DOS PACIENTES (Casos)****Formulário para a coleta de dados (Casos)**

Projeto: “Avaliação dos fenótipos de acetilação predominantes nas populações de 5 macro regiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase”

Pesquisador Responsável: Dr. Adalberto Rezende Santos

Nome da Unidade de Saúde:

UF:

Nº Prontuário:

Nome:

Data do Nascimento:

Sexo ()

Escolaridade:

Ocupação

Endereço:

Telefone:

Nº de cômodos na casa:

Renda Familiar:

Nº de pessoas residentes:

Convívio prévio com caso de hanseníase: S () N () NR ()

Tipo de contato: Pai () Mãe () Irmão () cônjuge ()

Parente consanguíneo ()

Parente não consanguíneo ()

Forma Clínica do Contato; PB () MB () NR ()

Data do Diagnóstico:

Classificação PB () MB ()

Forma Clínica I () T () D () V () NC ()

Biopsia Cutânea Sim () Não ()

Baciloscopia () N° de cruces



Grau de Incapacidade: 0 () 1 () 2 () NR ()

Doenças Concomitantes (listar):

Uso regular de álcool:

Em uso de medicamentos (listar):

Alergia (Especificar):

Exames Complementares S () N () NR ()

Hemograma:

Bioquímica Sanguínea:

Parasitológico Fezes:

Outros:

Esquema terapêutico: PB () MB ()

Data início:

Evolução após o Início do tratamento:

Data sintomas/sinais:

Caracterização dos Sinais e Sintomas:

Cutâneos

Hepáticos

Anemia Hemolítica

Síndrome da dapsona

Metahemoglobinemia

Exames Complementares S () N () NR ()

Hemograma

Bioquímica Sanguínea:

Parasitológico Fezes:

EAS:

Outros:

Diagnóstico:

Conduta:

Esquema Alternativo (especificar):

Data Início:

Evolução clínica:

Data Término:

Observações:



ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Avaliação dos fenótipos de acetilação predominantes nas populações de 5 macro regiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase”.

Nos próximos meses será realizado um estudo em pacientes com hanseníase. Neste estudo, pretende-se avaliar o gene (*NAT2*), envolvido na metabolização de uma droga usada no tratamento da hanseníase que pode estar associado com o desenvolvimento de efeitos colaterais. Este estudo será coordenado pelo Dr. Adalberto Rezende Santos, do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado a Micobactérias e Dra. Maria Eugênia Noviski Gallo, do Laboratório de Hanseníase, ambos do Instituto Oswaldo Cruz, IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro. Este termo de consentimento explica o estudo, portanto leia cuidadosamente e pergunte o que julgar necessário.

1) Procedimentos

Se eu concordar em participar deste estudo, responderei a um questionário padronizado que investigará algumas doenças que possam estar relacionadas a este gene. Serão coletados 5mL de sangue no meu antebraço, com agulha e seringa descartáveis, após higienização local. O sangue será utilizado para extração de DNA para avaliar a presença de variações genéticas no gene acima citado. Os dados gerados pela análise genética não serão divulgados nominalmente e sim sob forma de frequência. Esse material ficará armazenado em um banco de dados e somente será utilizado para futuros projetos mediante nova submissão e aprovação do Comitê de Ética da Instituição, bem como a concordância por escrito do sujeito da pesquisa.

2) Local do estudo

Os procedimentos referentes à coleta serão realizados na Fiocruz – RJ.

3) Riscos/Desconfortos

Algumas das questões que constam dos questionários podem ser inapropriadas e produzir sentimentos indesejáveis, mas, caso eu ache necessário, poderei interromper a entrevista a qualquer momento. Os riscos da retirada de sangue incluem introdução da agulha, desconforto temporário, pequena ferida e, raramente, infecção local.

3) Tratamento e compensação por danos

Se eu tiver algum problema de saúde em decorrência deste estudo, o tratamento será fornecido pela instituição participante. O custo deste tratamento será totalmente coberto pela verba do referido projeto.

4) Alternativas

Se eu decidir não participar neste estudo, ou interromper a minha participação a qualquer momento, o meu tratamento médico será mantido na unidade em que fui atendido.

5) Custos para os participantes

Não haverá custos para mim, caso decida pela minha participação neste estudo, nem para o tratamento que porventura necessitar.

6) Benefício



A coleta de sangue a qual eu irei me submeter ajudará o entendimento do aparecimento de efeitos colaterais devido ao uso da droga.

7) Reembolso

Não haverá benefícios financeiros para mim em participar no estudo.

8) Confidenciabilidade dos dados

Procedimentos serão adotados pelos responsáveis por este estudo no intuito de proteger as informações que eu forneça. As informações serão codificadas e mantidas em local reservado. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações e aos questionários. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos no computador com acesso restrito aos pesquisadores envolvidos. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida, portanto serão confidenciais como a lei determina.

CONSENTIMENTO

Receberei uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo. Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida sobre a minha participação neste estudo, poderei utilizar os seguintes números de telefone: (21) 2562-1564 ou (21) 99655-0762, para contatar os Drs. Adalberto R. Santos ou Maria Eugênia N. Gallo na Fiocruz/RJ.

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTÁRIA

Eu tenho o direito de não concordar em participar ou de me retirar deste estudo em qualquer momento que eu queira, sem riscos para o meu tratamento médico. Se eu concordar em participar, devo assinar na linha abaixo. Isso significa que compreendi adequadamente as informações fornecidas e este termo de consentimento.

Se eu desejar participar do estudo, permitirei também que meu endereço e telefone sejam anotados em uma folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário. Como já foi esclarecido anteriormente, toda informação pessoal será mantida em sigilo.

Assinatura do voluntário
(ou responsável legal)

Nome completo

Nº do prontuário

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

____/____/____
Data



ANEXO 4 - Tabela 5.5: Frequências dos genótipos de NAT2 encontrados na população estudada.

Genótipo	Frequências genotípicas											
	Total	RJ	GO	RO	TO	PE	Acre	ES	RN	RS	PR	Campos-RJ
	N (%)	N (%)	N (%)	(N%)	N(%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
*4,*4	56 (5,81)	5 (2,35)	9 (8,49)	3 (4,29)	5 (6,94)	4 (7,69)	4 (8,33)	9 (13,04)	1 (3,70)	16 (6,67)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*5A	14 (1,45)	2 (0,94)	0 (0,00)	9 (12,86)	0 (0,00)	1 (1,92)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*4,*5B	98 (10,17)	27 (12,68)	17 (16,04)	1 (1,43)	13 (18,06)	7 (13,46)	5 (10,42)	13 (18,84)	3 (11,11)	3 (1,25)	3 (30,00)	6 (10,53)
*4,*5C	9 (0,93)	3 (1,41)	2 (1,89)	1 (1,43)	0 (0,00)	1 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*4,*5D	6 (0,62)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (2,50)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*5N	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*6A	68 (7,05)	14 (6,57)	15 (14,15)	7 (10,00)	6 (8,33)	4 (7,69)	7 (14,58)	6 (8,70)	2 (7,41)	3 (1,25)	0 (0,00)	4 (7,02)
*4,*6H	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*6O	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*6P	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*4,*7B	13 (1,35)	2 (0,94)	2 (1,89)	5 (7,14)	1 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,45)	1 (3,70)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*12A	10 (1,04)	4 (1,88)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (4,17)	1 (1,45)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	1 (1,75)
*4,*12B	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*12C	2 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	1 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*12G	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*4,*12I	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*13A	42 (4,36)	12 (5,63)	0 (0,00)	2 (2,86)	1 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	24 (10,00)	0 (0,00)	3 (5,26)
*4,*14A	2 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*14B	7 (0,73)	3 (1,41)	1 (0,94)	0 (0,00)	3 (4,17)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*14H	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*New5	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*New6	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*New7	2 (0,21)	2 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*4,*New13	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)



Frequências genotípicas

Genótipo	Total	RJ	GO	RO	TO	PE	Acre	ES	RN	RS	PR	Campos-RJ
	N (%)	N (%)	N (%)	(N%)	N(%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
*4,*New14	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5A,*5A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5A,*5B	4 (0,41)	2 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5A,*6A	12 (1,24)	1 (0,47)	1 (0,94)	5 (7,14)	0 (0,00)	1 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,70)	2 (0,83)	0 (0,00)	1 (1,75)
*5A,*6H	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5A,*6O	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5A,*7B	5 (0,52)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (5,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5A,*13A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5A,*14B	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*5B	112 (11,62)	28 (13,15)	12 (11,32)	5 (7,14)	10 (13,89)	4 (7,69)	8 (16,67)	9 (13,04)	3 (11,11)	22 (9,17)	4 (40,00)	7 (12,28)
*5B,*5C	12 (1,24)	2 (0,94)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (4,17)	3 (4,35)	1 (3,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (5,26)
*5B,*5N	2 (0,21)	0 (0,00)	2 (1,89)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*5G	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*6A	87 (9,02)	19 (8,92)	12 (11,32)	2 (2,86)	10 (13,89)	10 (19,23)	4 (8,33)	10 (14,49)	4 (14,81)	6 (2,50)	0 (0,00)	10 (17,54)
*5B,*6F	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*6H	3 (0,31)	1 (0,47)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*6N	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*6O	2 (0,21)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*7B	25 (2,59)	7 (3,29)	1 (0,94)	1 (1,43)	4 (5,56)	2 (3,85)	3 (6,25)	1 (1,45)	2 (7,41)	2 (0,83)	0 (0,00)	2 (3,51)
*5B,*11A	2 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,45)	1 (3,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*12A	37 (3,84)	4 (1,88)	1 (0,94)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	28 (11,67)	0 (0,00)	2 (3,51)
*5B,*12B	24 (2,49)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	22 (9,17)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*12E	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*12M	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5B,*13A	30 (3,11)	22 (10,33)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,92)	2 (4,17)	0 (0,00)	2 (7,41)	1 (0,42)	0 (0,00)	1 (1,75)



Frequências genotípicas

Genótipo	Total	RJ	GO	RO	TO	PE	Acre	ES	RN	RS	PR	Campos-RJ
	N (%)	N (%)	N (%)	(N%)	N(%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
*5D,*5D	2 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,83)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5D,*5J	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5D,*7B	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5D,*13A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5D,*New14	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*5D,*New15	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*5T,*12B	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*6A	54 (5,60)	6 (2,82)	9 (8,49)	5 (7,14)	6 (8,33)	3 (5,77)	0 (0,00)	3 (4,35)	3 (11,11)	18 (7,50)	0 (0,00)	1 (1,75)
*6A,*6H	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*6O	2 (0,21)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*6A,*6P	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*7B	17 (1,76)	2 (0,94)	4 (3,77)	2 (2,86)	4 (5,56)	2 (3,85)	0 (0,00)	2 (2,90)	1 (3,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*11A	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*12A	9 (0,93)	0 (0,00)	1 (0,94)	1 (1,43)	0 (0,00)	2 (3,85)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	3 (5,26)
*6A,*12C	3 (0,31)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (4,35)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*12H	2 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,39)	1 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*13A	8 (0,83)	3 (1,41)	0 (0,00)	1 (1,43)	1 (1,39)	1 (1,92)	0 (0,00)	1 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*6A,*14A	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*14B	3 (0,31)	1 (0,47)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*20	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*New1	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)v	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*New2	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*New3	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*New4	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*6A,*New9	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (10,00)	0 (0,00)
*6O,*12A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)



Frequências genotípicas

Genótipo	Total	RJ	GO	RO	TO	PE	Acre	ES	RN	RS	PR	Campos-RJ
	N (%)	N (%)	N (%)	(N%)	N(%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
*6O,*New13	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7A,*7B	2 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,83)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7A,*11A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7B,*7B	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7B,*12A	2 (0,21)	1 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*7B,*12G	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7B,*13A	6 (0,62)	5 (2,35)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7B,*14B	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7B,*New15	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*7C,*New4	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12A,*12A	23 (2,39)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	22 (9,17)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12A,*12B	12 (1,24)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	12 (5,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12A,*12C	4 (0,41)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (1,67)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12A,*12E	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,92)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12A,*13A	4 (0,41)	3 (1,41)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12A,*14B	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,75)
*12A,*New3	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12A,*New12	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12C,*12C	2 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,83)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12C,*13A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,42)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12E,*13A	2 (0,21)	2 (0,94)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*12H,*14A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*13A,*13A	16 (1,66)	8 (3,76)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	8 (3,33)	0 (0,00)	0 (0,00)
*13A,*14B	4 (0,41)	4 (1,88)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*14A,*14A	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,43)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
*14B,*New3	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)



Frequências genotípicas

Genótipo	Total	RJ	GO	RO	TO	PE	Acre	ES	RN	RS	PR	Campos-RJ
	N (%)	N (%)	N (%)	(N%)	N(%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
*New5,*New6	1 (0,10)	1 (0,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
New10,*New11	1 (0,10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (10,00)	0 (0,00)
Total	964	213	106	70	72	52	48	69	27	240	10	57

