

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Elias Carvalho Padilha

**Tratamento de Tuberculose: Estudo de Interações
Farmacocinéticas da Isoniazida**

Araraquara 2011

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Elias Carvalho Padilha

**Tratamento de Tuberculose: Estudo de Interações
Farmacocinéticas da Isoniazida**

Monografia de Conclusão de Curso na
área de Toxicologia apresentado a
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” como requisito para obtenção do
Grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara 2011

Sumário

1) Introdução.....	1
1.1) Farmacologia clínica da Isoniazida.....	6
1.1.1 Mecanismo de ação	6
1.1.2 Absorção.....	6
1.1.3 Distribuição	7
1.1.4 Biotransformação.....	7
1.1.5 Excreção	8
1.1.6 Interações farmacológicas	8
1.2) Farmacologia Clínica da Rifampicina:	9
1.2.1 Mecanismo de ação:	9
1.2.2 Absorção.....	9
1.2.3 Distribuição	9
1.2.4 Biotransformação.....	10
1.2.5 Excreção	10
1.2.6 Interações Farmacológicas.....	11
1.3) Farmacologia clínica da Ciprofloxacina.....	11
1.3 Mecanismo de ação:	11
1.3.2 Absorção.....	12
1.3.3 Distribuição	12
1.3.4 Metabolismo	13
1.3.5 Excreção	13
1.3.6 Interações Farmacológicas.....	13
2) Objetivos.....	15
3) Desenvolvimento.....	16
3.1 Materiais e métodos	16
3.1.1 Animais.....	16
3.2 Protocolo experimental.....	16
3.2.1 Grupo Controle.....	17
3.2.2 Grupo INH:.....	17
3.2.3 Grupo tríade (INH+RMP+CYPRO)	17
3.3 Métodos Analíticos.....	18
3.3.1 Determinação da atividade enzimática de AST e ALT	20

3.3.2	Determinação de Bilirrubina	21
3.3.3	ALP – Fosfatase Alcalina	21
3.4	Análise farmacocinética	23
3.5	Análise Estatística.....	23
4)	Resultados	24
4.1	ALT e AST	24
4.2	Bilirrubina.....	28
4.3	ALP.....	29
4.4	Determinação de Isoniazida e metabólitos em plasma por HPLC	32
4.4.1	Curva de calibração da isoniazida (INH).....	32
4.4.2	Curva de calibração da hidrazina (Hz)	33
4.4.3	Curva de calibração da acetilisoniazida (AcINH)	34
5)	Discussão e Conclusão	37
6)	Referências bibliográficas	53

Resumo

O tratamento convencional da tuberculose constitui-se pela administração simultânea dos fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA) durante dois meses, seguida por quatro meses da associação INH e RMP.

Esta estratégia resulta em sucesso terapêutico na maioria dos casos quando existe obediência do paciente ao regime posológico. O abandono do tratamento tem sido relacionado ao longo período de exposição aos fármacos e ao aparecimento de efeitos adversos, entre eles, a hepatotoxicidade induzida por INH.

O período prolongado de tratamento, seus efeitos adversos, a alta taxa de abandono do tratamento e o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos convencionais tem estimulado a busca de novas alternativas terapêuticas para a tuberculose.

Neste sentido tem sido proposto o uso da fluoroquinolona Ciprofloxacina(CIPRO) no esquema terapêutico da tuberculose, em associação com INH e RMP.

Embora a associação de INH, RMP e CIPRO apresentem efeitos antibacterianos sinérgicos *in vitro* e supostamente seja proveitosa para o tratamento da tuberculose, sua influência sobre a hepatotoxicidade da isoniazida não é conhecida.

Considerando a importância do metabolismo da INH no desenvolvimento da hepatotoxicidade, a capacidade de indução ou inibição enzimática dos fármacos e a probabilidade de interação farmacocinética entre a INH, a CIPRO e a RMP, é possível que esta associação resulte em diferentes perfis farmacocinéticos com conseqüente alteração de efeitos hepatotóxicos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração simultânea de CIPRO e RMP sobre os parâmetros farmacocinéticos da INH e a produção de seus metabólitos em um grupo de animais (coelhos albinos) sob tratamento com INH e outro com INH+RMP+CIPRO bem como avaliar os níveis de biomarcadores de hepatotoxicidade – as transaminases AST e ALT, ALP e bilirrubina – antes e após a administração de doses múltiplas destes fármacos.

Na avaliação do perfil farmacocinético foi possível verificar que a associação com RMP e CIPRO resultou em aumento do clearance (Cl) e diminuição da meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), da constante de velocidade de absorção (k_a), da área sob a curva (ASC) e da concentração plasmática máxima (C_{max}) da INH assim como menores concentrações plasmáticas do metabólito acetilisoniazida. Observou-se apenas aumento significativo na atividade da ALT, porém inferior ao esperado quando INH está associada apenas à RMP. Os resultados obtidos sugerem que as interações produzem benefícios ao tratamento da tuberculose sob o ponto de vista da hepatotoxicidade do tratamento medicamentoso.

Lista de tabelas

Tabela 1	Fase móvel do sistema cromatográfico em modo gradiente	19
Tabela 2	Protocolo para determinação de ALP em plasma	21
Tabela 3	Valores da Curva de Calibração da ALT	23
Tabela 4	Valores para curva de AST	25
	Tabela de absorbância dos Padrões de Bilirrubina para	
Tabela 5	Cálculo do Fator de conversão de absorbância para mg/dL	27
	Comparações encontradas entre os parâmetros	
Tabela 6	farmacocinéticos entre os grupos animais	35
Tabela 7	Parâmetros obtidos da AcINH	35

Lista de Figuras

Figura 1	Procedimento analítico para a determinação da INH e seus metabólitos em plasma	18
Figura 2	Curva ALT	24
Figura 3	Média da variação ALT dos coelhos entre os grupos	25
Figura 4	Curva AST	27
Figura 5	Média da variação AST dos coelhos entre os grupos	27
Figura 6	Médias das diferenças de valores para cada grupo sobre o parâmetro Bilirrubina	28
Figura 7	Comparações sobre o parâmetros bioquímicos da Fosfatase alcalina(ALP) entre os grupos experimentais	29
Figura 8	Comparação estatística entre todos os grupos animais e parâmetros bioquímicos estudados	30
Figura 9	Curva de Calibração do derivado de Isoniazida de ASC/ [] de INH	31
Figura 10	Curva de Calibração do derivado de Hidrazina de ASC/ [] de Hz	32
Figura 11	Curva de Calibração do derivado de Acetilisoniazida de ASC/[] de AcINH	33
Figura 12	Perfis farmacocinéticos dos grupos estudados	35

Abreviaturas e Siglas

AcHz – Acetil hidrazina
AcINH – Acetil Isoniazida
ALP – Fosfatase alcalina
ALT – Alanina amino transferase
ASC – Área sob a Curva
ASAL – Arginino succinato liase
AST – Aspartato amino transferase
CIPRO - Ciprofloxacino
CK – Creatinina quinase
DP – Desvio padrão
GGT – Gama glutamil transferase
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
Hz - Hidrazina
INH - Isoniazida
LD – Lactato desidrogenase
MDR-TB – Tuberculose Multirresistente
OFX - Ofloxacino
 r^2 - Coeficiente de determinação
RMP - Rifampicina
TB - Tuberculose
TGO – Transaminase oxalacética
TGP – Transaminase pirúvica
UV – Ultra violeta
VS – Visível

1) Introdução

A tuberculose(TB) é uma doença conhecida há milhares de anos, no entanto o seu tratamento persiste como uma problemática entre os estudiosos. Embora inúmeras pesquisas tenham sido realizadas para o desenvolvimento de novas formas de tratamento, nenhuma conseguiu substituir definitivamente o esquema terapêutico (E-1) preconizado a mais de 30 anos: a associação da isoniazida(INH), rifampicina(RMP e pirazinamida(PYR)(De Souza e Vasconcelos, 2005). Na década de 80, os fármacos etambutol e estreptomicina foram introduzidos na terapêutica na reincidência da doença, uma vez ocorrendo a resistência bacteriana.

Atualmente a TB faz aproximadamente 3,0 milhões de vítimas por ano em todo o mundo, superando doenças como a AIDS, malária e doenças tropicais combinadas. Estima-se que cerca de 1,7 bilhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo *M. tuberculosis*, o que corresponde a 30% da população mundial. Neste contexto, o Brasil ocupa o 13º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos de TB do mundo. No Brasil, ocorrem cerca de 115 mil novos casos, com 6 mil mortes ao ano, sendo o Rio de Janeiro o estado com o maior número de casos (Vieira e Gomes, 2008).

Estes dados são ainda mais preocupantes quando a tuberculose associa-se à AIDS, cujo número de casos também é elevado no Brasil. Nestes casos a mortalidade chega a ser cerca de 20 vezes maior (Who Report, 2009). O tratamento (E-1) é constituído pela administração simultânea dos fármacos INH,

RMP e PZA durante dois meses, seguida por quatro meses de associação de INH e RMP. Desta forma o tratamento, em geral, transcorre por um período de 6 meses podendo estender-se em alguns casos. Esta estratégia farmacológica apresenta efetividade no tratamento para a maioria dos casos quando existe obediência do paciente ao regime terapêutico. O abandono do tratamento tem sido relacionado ao longo período de exposição aos fármacos e ao aparecimento de efeitos adversos.

Vieira e Gomes (2008) fizeram uma análise retrospectiva de 329 prontuários de pacientes sob tratamento E-1 e constataram que 49,1% dos casos relataram um ou mais efeitos adversos. Entre estes 10,6 % relacionaram-se a hepatopatia medicamentosa dos quais 29% necessitaram de modificação da terapêutica.

A patogênese da hepatite induzida por INH tem sido relacionada ao seu metabolismo, que leva à formação de compostos hepatotóxicos (Totsmann *et al*, 2007; Smith *et al*, 1972; Jain *et al*, 2009).

A metabolização da INH pode ocorrer por acetilação - por ação da N-acetiltransferase 2 (NAT-2) - e por hidrólise, gerando os metabólitos acetilisoniazida (AcINH) e hidrazina (Hz), respectivamente. A hidrazina pode sofrer ainda acetilação por NAT-2 levando à formação da acetilhidrazina (AcHz). A isoforma do CYP 2E1 (CYP2E1) oxida estes metabólitos para formar compostos que supostamente são importantes na hepatotoxicidade da INH (Jain *et al*, 2009).

O tratamento convencional E-1 propicia aumento da ação antimicrobiana por complementação de efeitos entre os fármacos. No entanto, sabe-se que a RMP é um clássico indutor enzimático da família citocromo P450 (CYP), inclusive da isoforma CYP2E1, que pode levar ao aumento da produção de compostos hepatotóxicos e maior risco de hepatopatias (De Rosa et al, 2007).

O abandono do tratamento é considerado um dos mais sérios problemas para o controle da tuberculose porque implica na persistência da fonte de infecção – o que favorece a sua transmissão - além de aumentar a taxa de mortalidade e recidiva da doença. Outro aspecto relevante em relação ao abandono do tratamento é o aparecimento, cada vez mais frequente, da Tuberculose multirresistente (MDR-TB); consequência do desenvolvimento de cepas de bacilos resistentes aos fármacos clássicos.

No Brasil o tratamento convencional tem eficácia de 72,6%, enquanto que a taxa de abandono é de 16,6% e a mortalidade chega a 5,7% (Ferreira *et al*, 2005; Rossettia *et al*, 2002). Assim, é evidente a necessidade de novas alternativas farmacológicas para o tratamento da tuberculose considerando o período prolongado de tratamento, seus efeitos adversos, a alta taxa de abandono e o aparecimento de cepas resistentes a estes fármacos.

Na década de 80 foi sintetizada uma série de compostos chamados fluoroquinolonas - antibacterianos de amplo espectro de atividade - que foram consideradas por Di Prerry G e colaboradores (2004) a única classe de relevância no tratamento da tuberculose dos últimos 20 anos. Dentre os fármacos desta classe os de primeira geração: ciprofloxacino (CIPRO) e ofloxacino (OFX) são

reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde como fármacos de segunda linha no combate a Tuberculose Multirresistente (MDR-TB).

Souza e Vasconcelos (2005) propõem que o grupo das fluoroquinolonas figurem entre os fármacos de primeira escolha no tratamento da tuberculose devido a alta biodisponibilidade oral somada à baixa concentração inibitória mínima (MIC). Os efeitos antimicobacterianos sinérgicos destes produtos reforçam os benefícios desta associação (Berning et al, 2001)

A associação desta nova classe de fármacos realmente resulta no aumento da atividade antibacteriana, no entanto, pode resultar em aumento da hepatotoxicidade da INH, uma vez que a CIPRO também interfere com as enzimas do CYP450 como descrito em sua farmacologia a seguir (Browsers et al, 2009).

Barriere e colaboradores (1989) reportaram que a RMP interfere no perfil farmacocinético da CIPRO, supostamente induzindo uma isoforma do CYP relacionada ao seu metabolismo com consequente aumento de Clearance (em aproximadamente 50%) e diminuição das suas concentrações plasmáticas. Este fato pode interferir significativamente no resultado clínico do tratamento.

Embora a associação de INH, RMP e CIPRO apresentem efeitos antibacterianos sinérgicos *in vitro* e supostamente seja proveitosa para o tratamento da tuberculose, sua influência sobre a hepatotoxicidade da isoniazida não é conhecida, embora já se conheça a interação farmacocinética entre INH e

CIPRO, provando que há interferência nos parâmetros cinéticos da INH (Bhusal et al, 2005; Ofoefule et al, 2001; 2002).

Para a avaliação da hepatotoxicidade em animais têm sido utilizados critérios tais como aparecimento de necrose tissular e inflamação intralobular do fígado no exame histopatológico e níveis séricos das transaminases três vezes superiores aos estabelecidos como referência (Eminzade et al, 2008; Attri et al, 2000).

A investigação experimental da toxicidade de fármacos requer a disponibilidade de modelos animais apropriados e de fácil acesso. Assim, considerando-se a conveniência da espécie, grande parte das pesquisas são conduzidas utilizando-se ratos Wistar (Emizade et al, 2008; Tasduq et al 2005) porém alguns estudos demonstram que neste animal não se observa indução enzimática pela RMP - que relaciona-se à exacerbação da hepatotoxicidade induzida por INH - à semelhança do homem (De Rosa et al, 2007).

Assim, tem sido sugerida a utilização de coelhos para a investigação da hepatotoxicidade induzida por isoniazida (Sarich et al, 1995; 1999). Este modelo animal apresenta susceptibilidade enzimática – efeito indutor da RMP – semelhante ao homem, o que representa grande vantagem para posterior extrapolação de dados obtidos nos estudos de metabolismo e interações farmacocinéticas em animais para o homem.

Considerando a importância do metabolismo da INH no desenvolvimento da hepatotoxicidade, a capacidade de indução ou inibição enzimáticas dos

fármacos e a probabilidade de interação farmacocinética entre a INH, a CIPRO e a RMP, é possível que esta associação resulte em diferentes perfis farmacocinéticos com consequente alteração na indução de efeitos hepatotóxicos.

Assim, o presente trabalho visa avaliar os efeitos da administração simultânea de CIPRO sobre os parâmetros farmacocinéticos da INH e a produção de seus metabólitos em um grupo de animais sob tratamento com INH+CIPRO e outro com INH+RMP+CIPRO, bem como os níveis de biomarcadores de hepatotoxicidade - as transaminases AST e ALT; bilirrubina e ALP – antes e após administração de doses múltiplas destes fármacos.

1.1) Farmacologia clínica da Isoniazida.

1.1.1 Mecanismo de ação

A isoniazida é um fármaco antibacteriano - utilizada tanto no tratamento profilático quanto na doença ativa da tuberculose - que inibe a síntese do ácido micólico, componente essencial da parede celular da micobactéria, sendo as enzimas enoil-acil redutase (InhA) e β -cetoacil-acil sintase responsáveis pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa (Sarich et al, 1995).

1.1.2 Absorção

A dose diária de INH recomendada é de 5mg/kg/dia com máximo de 300 mg para adultos e 10 a 20 mg/kg/dia para crianças. Existem evidências de apreciável metabolização pré-sistêmica após a administração oral da INH. No

entanto, não se encontram estabelecidos os valores da biodisponibilidade oral (Hardman e Limbird, 2004).

O fármaco é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal com picos de concentrações plasmáticas de 3 a 5µg/mL após administração de 5 a 20mg/Kg, atingidos entre 1 a 2 horas. A absorção e a biodisponibilidade são reduzidas quando a isoniazida é administrada na presença de alimentos e antiácidos (Kashuba et al, 1998).

1.1.3 Distribuição

Após a absorção, a isoniazida é distribuída por todo o organismo, tecidos e fluidos (pleural, ascítico, saliva, cérebro espinhal) em níveis similares aos níveis séricos. Sua ligação com as proteínas plasmáticas é de aproximadamente 10-15% e o volume de distribuição de aproximadamente 0,6 L/Kg em voluntários sadios com peso normal (Peloquin et al, 1997).

1.1.4 Metabolização

O metabolismo da isoniazida envolve uma etapa inicial de acetilação para formar acetil-isoniazida, mediada pela N-acetiltransferase 2(NAT-2) (Tasduq et al, 2005). A etapa subsequente é a hidrólise, com liberação de ácido isonicotínico e acetil-hidrazina. A acetil-hidrazina pode sofrer acetilação originando diacetil-hidrazina ou sofrer oxidação microssomal, mediada por isoformas do CYP principalmente CYP2E1, para originar metabólitos reativos com potencial hepatotóxico, como a hidrazina, que pode ser formada por hidrólise direta da isoniazida ainda nas etapas iniciais de sua metabolização.

1.1.5 Excreção

A meia vida da isoniazida em voluntários sadios varia de 1 a 4 horas (70 minutos em acetiladores rápidos e 2 a 5 horas em acetiladores lentos). A meia vida plasmática pode ser prolongada para 4,3 horas em pacientes com disfunção renal moderada ou insuficiência renal (Kashuba et al, 1998).

A excreção urinária de isoniazida em adultos com função renal normal é de aproximadamente 50-70% da dose de 5mg/Kg. A porcentagem de diferentes compostos excretados varia de acordo com o fenótipo acetilador. Já a excreção através do leite materno é em torno de 0,75-2,3% da dose em 24h. Pequenas quantidades do fármaco são excretadas através da saliva, escarro e em fezes (Kashuba et al, 1998).

O clearance da isoniazida é de aproximadamente 3,7 mL/min em acetiladores lentos e 7,4 mL/min em acetiladores rápidos (Kashuba et al, 1998).

1.1.6 Interações farmacológicas

O citocromo CYP3A é bastante abundante nos seres humanos e é responsável pelo metabolismo de 60% dos fármacos conhecidos no mercado. Especificamente a isoforma CYP3A4 é susceptível à inibição por uma grande diversidade de fármacos, o que pode acarretar diminuição do metabolismo de antibacterianos tais como a claritromicina, a eritromicina e a isoniazida. Assim, no tratamento da tuberculose, a associação de fármacos pode levar à interações farmacocinéticas com consequente interferência na produção de metabólitos da INH (Zhou et al, 2005).

1.2) Farmacologia Clínica da Rifampicina:

1.2.1 Mecanismo de ação:

A RMP, derivado semi-sintético da rifamicina B, atua inibindo a RNA-polimerase DNA-dependente de micobactérias e de outros microorganismos, através da formação de um complexo estável fármaco-enzima, resultando em supressão do início da formação da cadeia na síntese de RNA. As micobactérias podem desenvolver rapidamente resistência à rifampicina, de modo que este antibiótico não deve ser utilizado isoladamente na quimioterapia da tuberculose (Hardman e Limbird, 2004).

1.2.2 Absorção

A RMP tem uma biodisponibilidade oral de 90%. A administração oral de RMP produz concentrações plasmáticas máximas em 2 a 4 horas; após a administração de 600mg, este valor varia em torno de 7-12 µg/mL (Ellenhorn e Barceloux, 1998; Hardman e Limbird, 2004).

1.2.3 Distribuição

Após absorção no trato gastrointestinal, cerca de 80% do fármaco liga-se às proteínas plasmáticas (Acoecella et al, 1978).

A RMP distribui-se por todo o organismo, possuindo volume de distribuição aparente de 1,6L/Kg sendo encontrada em concentrações eficazes em muitos órgãos e líquidos corporais, como LCR (líquido céfalo raquidiano (Ellenhorn e Barceloux, 1998; Hardman e Limbird, 2004). A sua extensa

distribuição pode ser demonstrada pelo fato do fármaco conferir coloração laranja-avermelhada à urina, fezes, saliva, escarro, lágrimas e suor (Hardman e Limbird, 2004).

1.2.4 Metabolização

A RMP pode ser metabolizada ou por hidrólise dando origem a formil-rifampicina ou por desacetilação formando a desacetil-rifampicina ³⁰ a qual retém praticamente toda a atividade antibacteriana. De forma que após 6 horas da ingestão do fármaco ele encontra-se na bile quase todo na forma desacetilada. A reabsorção intestinal é reduzida devido ao processo de desacetilação e pela presença de alimento (Hardman e Limbird, 2004).

1.2.5 Excreção

A RMP sofre rápida eliminação via bile, em consequência da circulação entero-hepática. A forma desacetilada é predominantemente encontrada na bile.

A meia vida de eliminação da RMP varia de 1,5 a 5 horas e aumenta na presença de disfunção hepática; porém pode estar reduzida em pacientes que recebem INH concomitantemente. A meia vida diminui progressivamente em cerca de 40% durante os primeiros 14 dias de tratamento, devido à indução de enzimas microssomais hepáticas, com aceleração da acetilação do fármaco.

Até 30% de uma dose de RMP são excretados na urina, enquanto 60 a 65% são excretados nas fezes, sendo que menos da metade deste valor consiste no antibiótico inalterado. Pacientes com disfunção renal, não necessitam de ajuste da posologia (Kashuba et al, 1998).

A RMP na forma inalterada e seu metabólito desacetil-rifampicina, ambos farmacologicamente ativos, são excretados primariamente na bile e posteriormente na urina enquanto que o metabólito formil-rifampicina tem excreção exclusivamente renal (Acoecella et al, 1978)

O clearance da RMP é de 8,7 ml/mim/Kg (Zhou et al, 2005)

1.2.6 Interações Farmacológicas

Este fármaco é um potente indutor das isoformas do CYP450 e de uma série de enzimas envolvidas na metabolização de fármacos. De Rosa e colaboradores verificaram em seus estudos que a administração concomitante de RMP+INH pode levar ao aumento da toxicidade causada pela INH devido à indução dessas isoformas do CYP450, que estão relacionadas com a conversão da AcHz, metabólito da INH, a compostos reativos e hepatotóxicos. As principais isoformas induzidas pela RMP são CYP3A4, 1A2, 2C9, 2C19 e 2E1 entre outras.

A RMP, como indutor enzimático, é capaz de intensificar a sua própria biotransformação e diminuir sua meia vida plasmática quando administrada em doses múltiplas como descrito anteriormente (Douglas e Mcleod, 1999).

1.3) Farmacologia clínica do Ciprofloxacino

1.3 Mecanismo de ação:

O ciprofloxacino é um agente antibacteriano sintético da classe das quinolonas (derivados do ácido nalidixico); possui uma eficácia muito bem demonstrada para os microorganismos aeróbicos gram-negativos (incluindo

Pseudomonas aeruginosa) e gram-positivos (como *estafilococcus* e os *estreptococcus*).

Na fase proliferação bactericida ocorre enrolamento e desenrolamento segmentar dos cromossomos, devido à ação de uma enzima denominada DNA-girase. O ciprofloxacino inibe a DNA-girase de forma a impedir o metabolismo bacteriano, uma vez que as informações vitais não podem mais ser lidas a partir do cromossomo bacteriano a bactérias deixa de se reproduzir e produzir proteínas vitais, resultando em efeito bactericida.

1.3.2 Absorção

A ciprofloxacina é absorvida pelo trato gastrointestinal. Na administração oral de 500mg observa-se concentrações plasmáticas de 2,97µg/mL.

1.3.3 Distribuição

A ligação protéica do ciprofloxacino é baixa (20 – 30%) e a substância no plasma encontra-se fundamentalmente sob a forma não ionizada. O ciprofloxacino pode difundir-se livremente para o espaço extravascular. O volume de distribuição da ciprofloxacina é de aproximadamente 2,8l/Kg. Distribui-se amplamente nos tecidos líquidos corporais e células humanas, atingindo elevado volume de distribuição, volumes estes mais elevados do que no sangue.

1.3.4 Metabolismo

A ciprofloxacina sofre metabolização hepática através de oxidação microssômica ao nível do citocromo P 450 e de conjugação com o ácido glicurônico.

1.3.5 Excreção

A meia vida da ciprofloxacina é cerca de 3 a 4 horas em pacientes com funções renal e hepática normais. É amplamente excretado sob forma inalterada por filtração glomerular e secreção tubular e, em menor extensão, por secreção transintestinal ativa.

O clearance renal é de aproximadamente 5 ml/min/kg.

1.3.6 Interações Farmacológicas

Estudos comprovam que a CIPRO inibe as isoformas CYP1A2 e 3A4, o que pode interferir com o metabolismo de outros fármacos que utilizam estas enzimas em seu metabolismo.

Outra forma de interação é com a isoniazida. Ofoefule et al(2002 e 2001) publicaram estudos indicando que a CIPRO influi na absorção da INH no trato gastrointestinal e aumenta a excreção do fármaco pela urina em 38%. Porém o uso da associação foi considerado seguro.

Com relação a RMP há interações de forma que a RMP induz o metabolismo da CIPRO através da indução de isoformas de CYP responsáveis pelo metabolismo da mesma (Barriere et al, 1989).

2) Objetivos

- Reprodução dos parâmetros do método bioanalítico, desenvolvido anteriormente pelo grupo de pesquisa, necessários para a determinação da isoniazida e metabólitos em plasma neste trabalho;
- Avaliar o perfil farmacocinético da isoniazida isoladamente e associada a Rifampicina e Ciprofloxacino em coelhos albinos;
- Estabelecer os valores basais dos parâmetros ALT,AST e bilirrubina neste modelo animal através do grupo controle;
- Avaliar os mesmos parâmetros bioquímicos nos coelhos albinos quando expostos a doses múltiplas de isoniazida isoladamente e em associação;
- Realizar a análise estatística entre os grupos para verificar diferenças e semelhanças entre os valores dos parâmetros bioquímicos e farmacocinéticos.

3) Desenvolvimento

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Animais

Foram utilizados como modelo animal 15 coelhos Albinos machos (3-5Kg), provenientes do Biotério Central da UNESP Botucatu. Os animais foram transferidos para o biotério do departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP campus Araraquara, os quais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h), luzes acesas as 07h). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e com acesso a alimento e água à vontade. Os animais ficaram privados de alimento por 12 horas anteriores às administrações dos fármacos.

3.2 Protocolo experimental.

O projeto envolveu a utilização de 15 animais, distribuídos em 3 grupos, a saber: Controle, Grupo INH e Grupo Tríade detalhados a seguir. Foram colhidas amostras de sangue pela veia marginal da orelha com dois intuitos analíticos diferentes: Para a realização de exames bioquímicos, colheu-se sangue antes do início do protocolo ao seu sétimo dia; e para a análise farmacocinética, colheu-se ao sétimo dia de administração de forma seriada em 13 tempos distintos detalhados a seguir para a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo para os grupos de animais que receberão os fármacos. Este protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Protocolo n.37/2009).

3.2.1 Grupo Controle

Para os animais deste grupo (n=5) foi administrada água estéril por gavagem, diariamente, por um período de 7 dias. O objetivo da inclusão desse grupo foi a verificação de possíveis alterações dos parâmetros bioquímicos em animais submetidos ao estresse da administração diária por gavagem e alterações enzimáticas decorrentes do estresse sofrido pelo animal devido à sua constante manipulação (7 dias). Ao sétimo dia foram coletadas amostras de sangue para avaliação dos parâmetros bioquímicos relacionados à hepatotoxicidade (descritos adiante).

3.2.2 Grupo INH:

Os animais deste grupo (n=5) receberão doses diárias de 50mg/Kg de isoniazida pela via oral (gavagem) por um período de 7 dias.

A cinética da isoniazida foi investigada com base na relação concentração plasmática vs tempo. As amostras seriadas foram coletadas pela veia marginal da orelha nos tempos 0; 15'; 30'; 45'; 60'; 2h; 4h; 6 h; 8h; 10 h; 12h, 18h e 24h . O sangue foi colhido em tubo heparinizado e centrifugado a 1800g por 10 minutos e os plasmas mantidos a – 20 °C até a realização das análises laboratoriais.

3.2.3 Grupo tríade (INH+RMP+CYPRO)

Os animais deste grupo (n=5) receberam doses diárias de 50 mg/kg de isoniazida, 100 mg/kg de rifampicina (Tayal et al, 2007) e 50mg/Kg de

ciprofloxacina (Peterson et al, 2006) pela via oral (gavagem), por um período de 7 dias. O mesmo procedimento para a investigação da farmacocinética da INH descrito no item 4.2.1. foi utilizado.

3.3 Métodos Analíticos

A determinação de isoniazida e seus metabolitos hidrazina, acetilhidrazina e acetilisoniazida foi realizada por HPLC cujo método foi desenvolvido por Seifart e colaboradores (1995) e validado por De Rosa et al(2007) em nosso laboratório de pesquisa. Na **figura 1** está descrito o procedimento analítico que foi utilizado para o processamento das amostras.

Para a detecção dos compostos, foi utilizado o sistema de cromatografia líquida (HPLC) Waters Alliance equipado com detector UV-VS 2487, operando a 340 nm, coluna Resolve TM C₁₈ (5µm, 90 A, 3,9mm x 300mm) com injetor automático. A fase móvel constituiu-se dos solventes isopropanol (A), acetonitrila (B) e tampão fosfato de potássio monobásico 0,05M (C) em modo gradiente com início e término da análise nas proporções de 8% de A; 32% de B e 60% de C (**Figura 1**), com fluxo de 1mL/min.

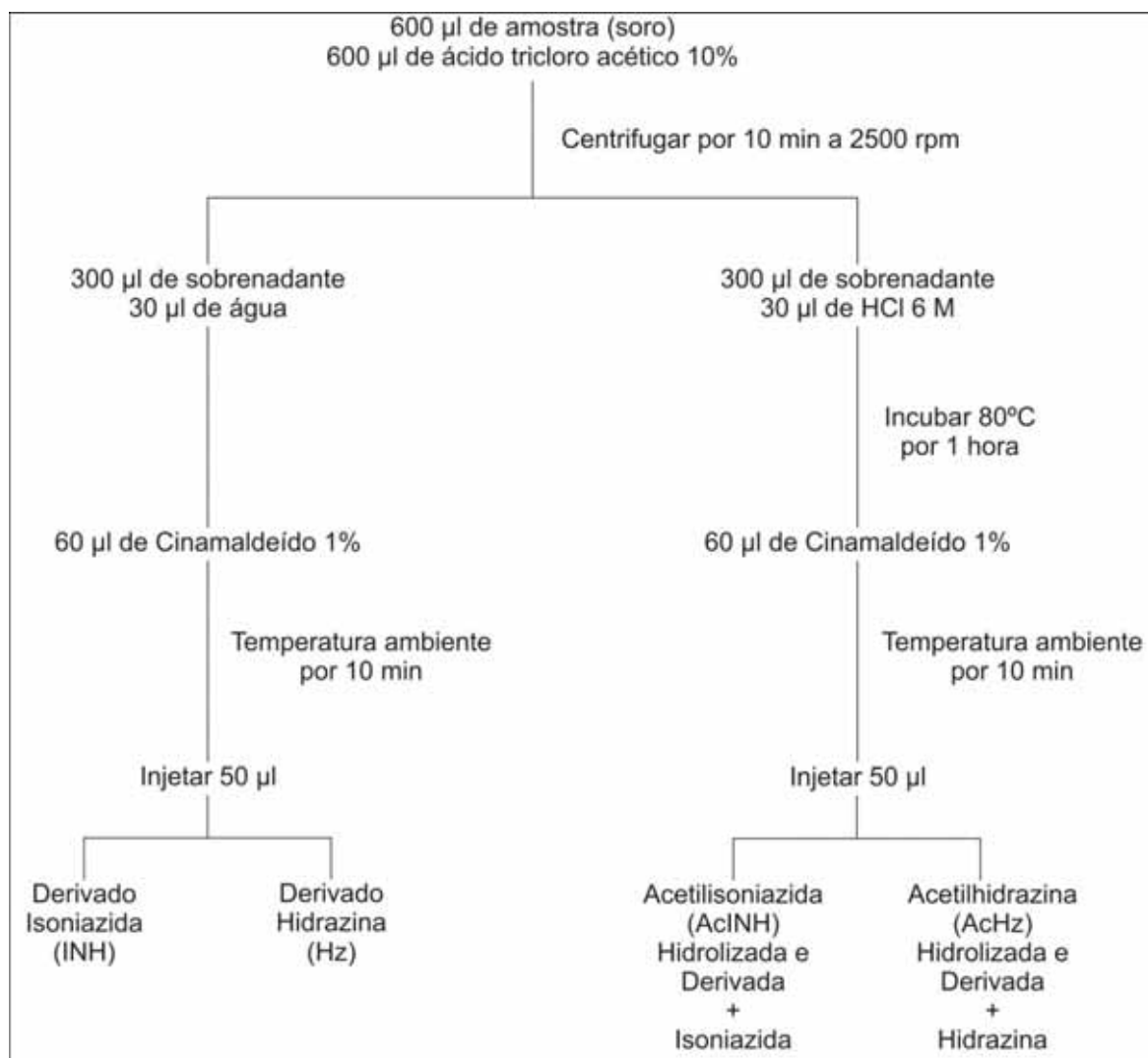


Figura 1 – procedimento analítico para a determinação da INH e seus metabólitos em plasma

Tabela 1. Fase móvel do sistema cromatográfico em modo gradiente.

Solventes			
Tempo (min)	Isopropanol (A)	Acetonitrila (B)	Tampão fosfato (C)
0	8	32	60
1	8	32	60
10	14	56	30
15	14	56	30
16	8	32	60
18	8	32	60
23	8	32	60

As condições cromatográficas foram aquelas determinadas por De Rosa et al (2007).

3.3.1 Determinação da atividade enzimática de AST e ALT

As determinações de ALT e AST foram realizadas por método colorimétrico - reação de Reitman Frankel (Kit Labtest). As etapas envolvidas na determinação das transaminases estão descritas abaixo:

Aspartato Aminotransferases (AST ou TGO) - método colorimétrico - a reação de AST resulta na formação de oxalacetato, que é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensa cor em meio alcalino (Kit Reagente Labtest).

Alanina Aminotransferase (ALT ou TGP) – método colorimétrico – a reação de ALT resulta na formação de piruvato, que é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensa cor em meio alcalino (Kit Labtest).

As análises de transaminases foram realizadas antes e depois do protocolo estipulado para o tratamento de cada grupo de animais.

3.3.2 Determinação de Bilirrubina

A bilirrubina é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525nm. A bilirrubina direta (diglicurônide) é determinada em meio aquoso, enquanto a total(direta e indireta) é determinada por potente solubilizador de ação catalisadora. O ensaio foi realizado através da utilização do kit labtest ref.31 (Colorimétrico - Sims-Horn).

3.3.3 ALP – Fosfatase Alcalina

A atividade da ALP em plasma foi determinada através de um método cinético desenvolvido em nosso laboratório que baseia-se na conversão do substrato 4-nitrofenil fosfato - incolor - que por ação da ALP em pH básico(em torno de 10,3) é convertido em 4-nitrofenóxido – amarelo – cuja absortividade proporciona a sua quantificação no comprimento de onda de 403nm.

O substrato p-nitrofenil fosfato foi preparado a 24,5mM/L em tampão MAP e o acetato de magnésio foi diluído a 3mM/L em água deionizada. O procedimento foi realizado de acordo com a tabela 5. Todos os reagentes, inclusive a amostra, foram acondicionados em estufa antes do teste até que

atingissem a temperatura de 30°C, ideal para a atividade da enzima. O espectrofotômetro também foi pré-aquecido para a realização dos testes.

O método seguiu o protocolo abaixo:

Tabela 2- protocolo para determinação de ALP em plasma

Teste Reduzido de ALP	
Cinético	
Reagente	Quantidade
Acetato de Mg	100uL
Amostra	5uL
	<i>Termostatizar a</i>
	30°
Substrato	200uL

As leituras foram realizadas a cada minuto, durante 5 minutos para realização dos cálculos e determinação da atividade enzimática.

A atividade da ALP em plasma foi determinada através do seguinte cálculo $U/L = \Delta A / \text{min} \times 3245$.

O coeficiente de 3245 foi obtido da curva de calibração da ALP por este método.

3.4 Análise farmacocinética

A disposição cinética da isoniazida foi avaliada após a administração de doses múltiplas em coelhos albinos por gavagem (7 dias). Os parâmetros: concentração plasmática máxima (C max) e tempo para atingir Cmax (t max) foram obtidos diretamente dos dados experimentais. Os demais parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo. As meias-vidas e as constantes de velocidade (absorção, eliminação) foram determinadas após a definição do modelo bicompartimental que foi o que melhor se adaptou aos dados experimentais. As constantes de velocidade foram calculadas através da equação $0.693/T_{1/2}$. A área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (AUC_{0-∞}) foram calculadas através do método dos trapezóides. Esse parâmetro foi empregado nos cálculos do clearance total aparente ($Cl/f = \text{dose}/\text{AUC}$) e no volume aparente de distribuição ($Vd/f = Cl/f/\beta$).

3.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram apresentados através das medianas (Intervalo de confiança 95%). O teste de Wilcoxon foi empregado para avaliar as diferenças obtidas nos parâmetros farmacocinéticos da INH entre os grupos.

Serão empregados os programas GraphPadInstat®, versão 3.0, para Windows 95/NT e Microcal™Origin™, versão 5.0, para a realização dos cálculos.

Foi considerado o nível de significância de $p < 0.07$.

4) Resultados

4.1 ALT e AST

Para que se realize a interpretação correta das absorbâncias lidas no espectrofotômetro foi necessária a confecção de curvas de calibração que podem ser encontradas no manual do kit labtest e executadas para cada kit que foi utilizado. Para este experimento foram utilizadas as seguintes curvas.

Estes gráficos servem de referência especificamente para o kit e aparelho utilizado, quando se obtiver um valor de absorbância de uma amostra animal, utilizam-se os gráficos para estimar os valores das enzimas em Unidades/L. Estes gráficos são construídos a partir de um padrão de concentração conhecida utilizando-se piruvato de sódio 2 mmol, tanto para ALT quanto para AST, cujos valores de referência previamente estão previamente estabelecidos.

As tabelas expressam os valores relativos à variação intra-animal de cada parâmetro, ou seja, o quanto a enzima variou em cada animal do começo até o fim do experimento. Esta forma de demonstrar os resultados torna-se mais fiel ao impacto do medicamento sobre o animal e os resultados tendem a variar menos devido à peculiaridades inter-animal.

Tabela 3 – Valores da Curva de Calibração da ALT

Curva ALT	
Referência	Absorbância
0	0,256
28	0,34
57	0,429
97	0,515

150	0,57
-----	------

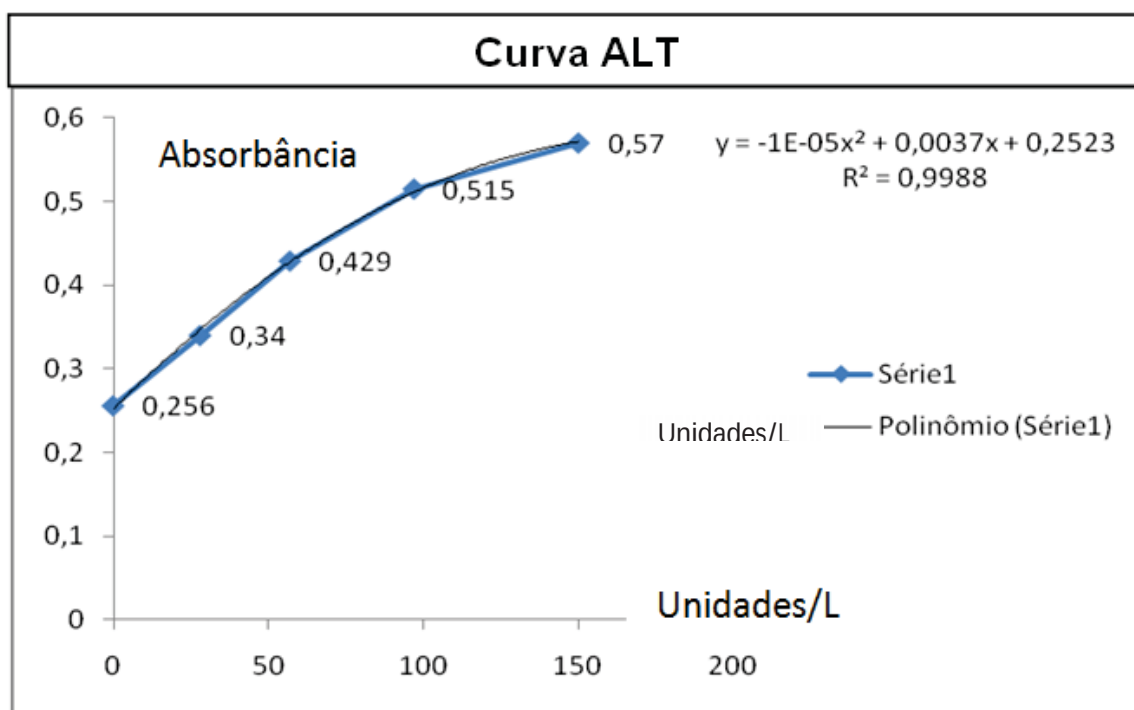


Figura 2 – Curva ALT

O marcador ALT obteve valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) para o grupo “pré e pós associação” em relação à variação deste marcador no grupo INH, resultados demonstrados graficamente pela figura 8.

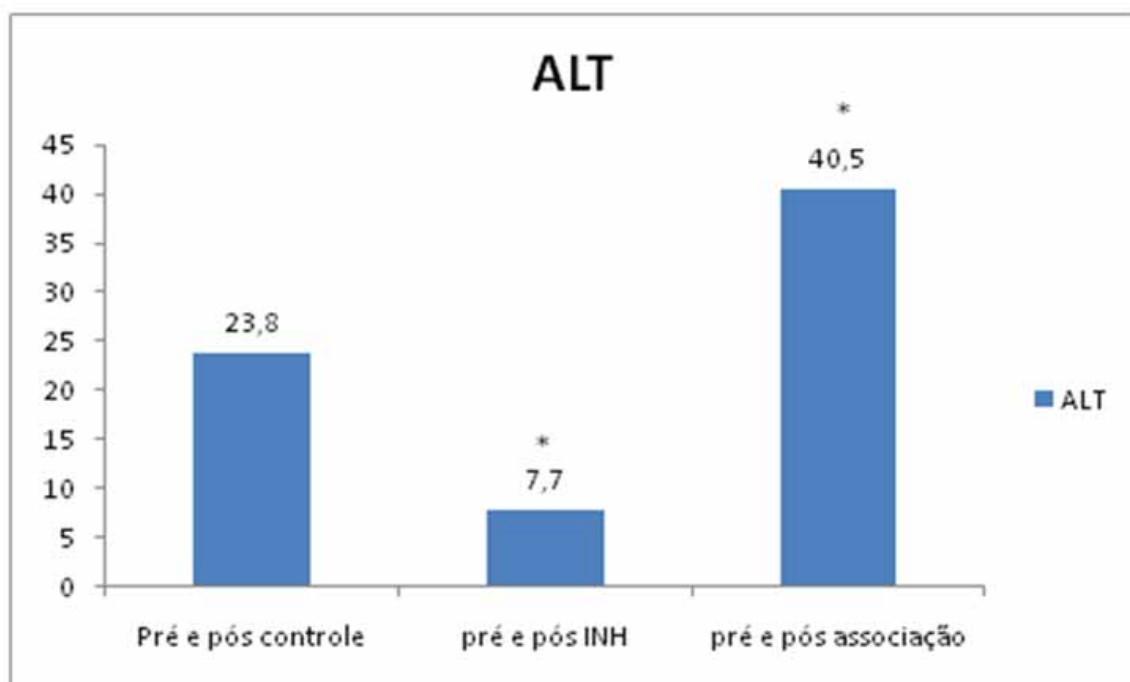


Figura 3 – Média da variação ALT dos coelhos entre os grupos (* colunas que tiveram $p < 0.05$)

A curva de calibração para a atividade da AST está demonstrada na Tabela 5 e figura 4.

Tabela 4 – Valores para curva de AST

Curva AST	
Referência	Absorbância
0	0,209
24	0,294
61	0,379
114	0,443
190	0,489

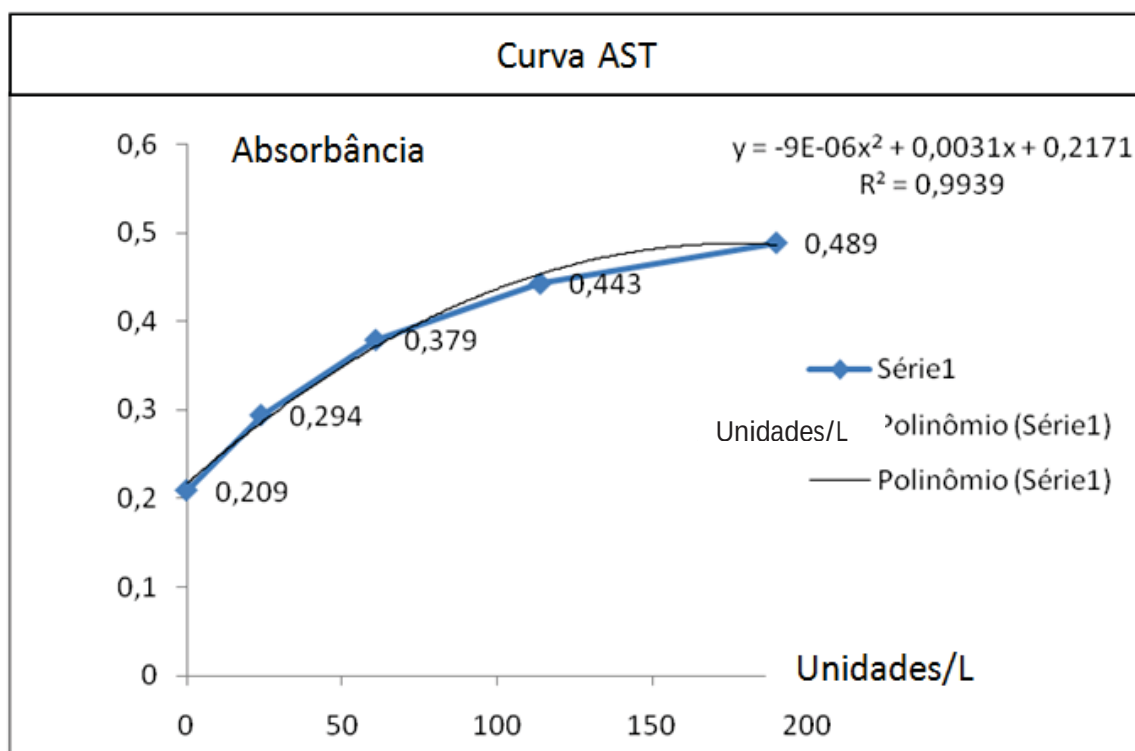


Figura 4 – Curva AST

Na figura 5 apresentamos a variação de AST para os grupos estudados. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

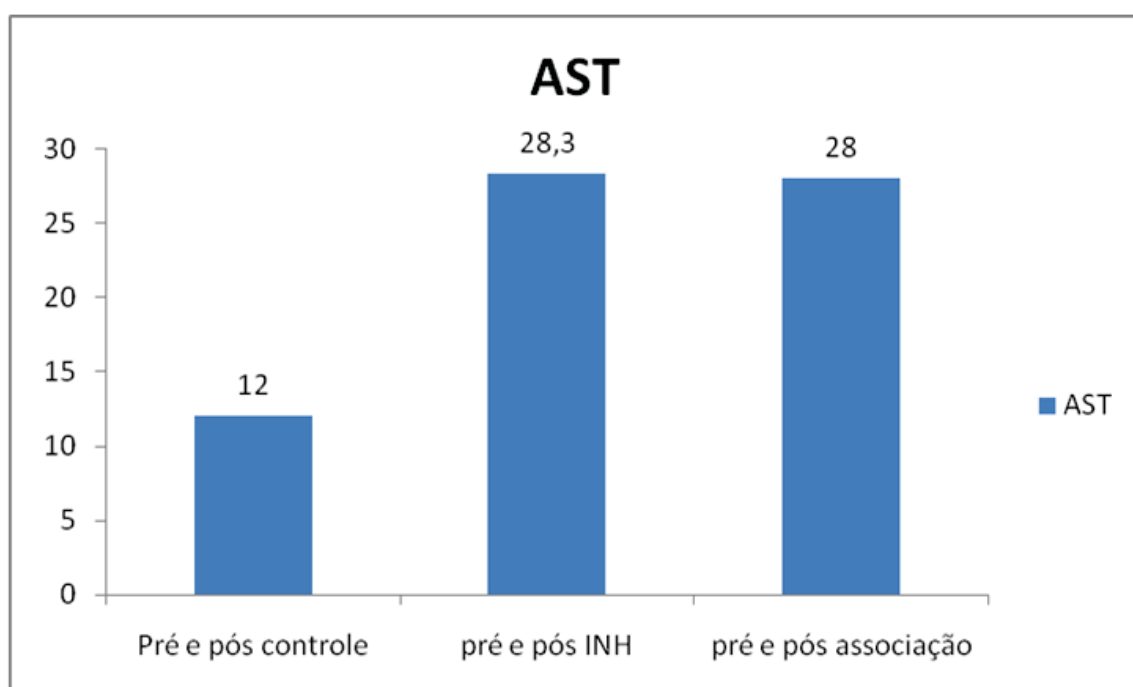


Figura 5 – Média da variação AST dos coelhos entre os grupos

4.2 Bilirrubina

Para a determinação da bilirrubina foi necessário a determinação de um fator para converter absorbância em mg/dL. Para isso fez-se a medida do padrão de bilirrubina em triplicata (kit labtest ref.31). Na tabela 6 estão demonstrados os valores obtidos para as replicatas dos padrões de bilirrubina.

Tabela 5 – Tabela de absorbância dos Padrões de Bilirrubina para cálculo do Fator de conversão de absorbância para mg/dL

Padrão	Absorbância
P1	0,331
P2	0,333
P3	0,338
Soma	1,002
Média	0,334

$$\text{Fator} = \frac{10}{0,337} = 30$$

Após a obtenção dos valores de absorvância, procedeu-se a determinação do fator, através da equação acima descrita ($10/\text{Absorvância do padrão}$). Neste experimento obteve-se fator igual a 30. Este fator foi a referência para toda medida de bilirrubina posteriormente realizada.

Os valores de bilirrubina no modelo animal estão demonstrados na figura 6. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

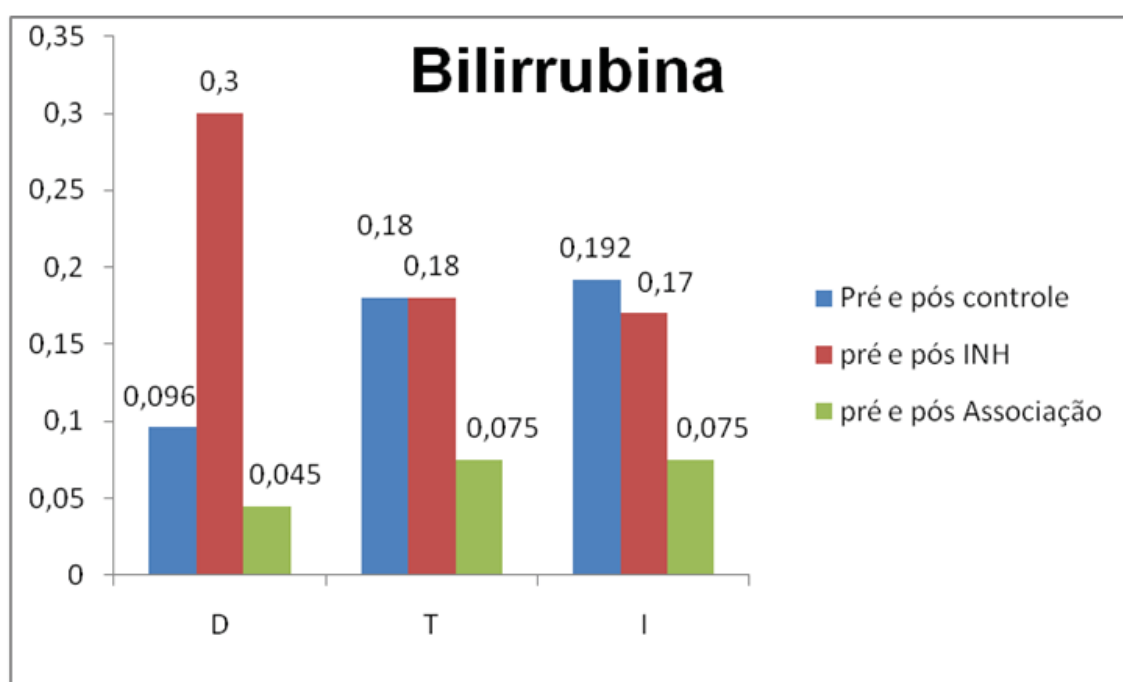


Figura 6 – Médias das diferenças de valores para cada grupo sobre o parâmetro Bilirrubina

4.3 ALP

Na figura 7 apresenta-se a variação da ALP em cada grupo. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

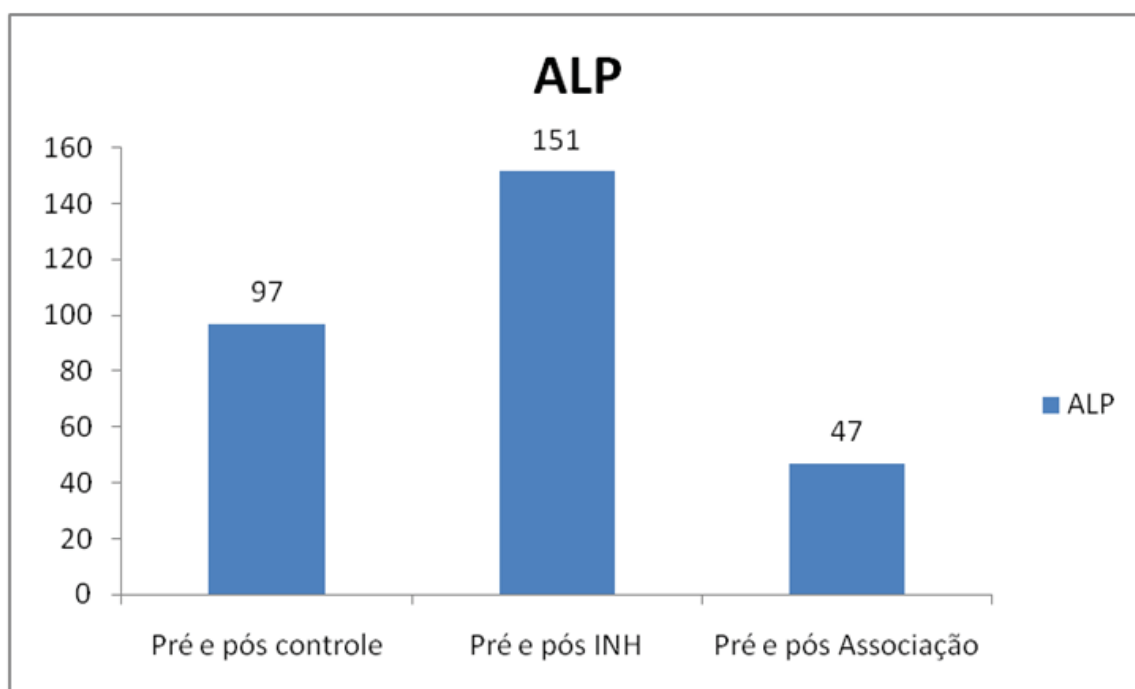


Figura 7 – Comparações sobre o parâmetros bioquímicos da Fosfatase alcalina(ALP) entre os grupos experimentais

Em vista dos resultados obtidos, a figura 8 representa as variações estatísticas em valores absolutos das enzimas ALT, AST e ALP entre todos os grupos animais conforme descrito na tabela. Pode-se observar que existem diferenças estatísticas significativas entre os grupos em vários casos (figura 11).

	Controle Pré	Controle Pós	INH Pós	Associação Pré	Associação Pós	RMP + INH Pré	RMP + INH Pós
Controle Pré							
Controle Pós							
INH Pós							
Associação Pré							
Associação Pós							
RMP + INH Pré							
RMP + INH Pós							
Símbolos							
	não significativo	Significativo e maior	Significativo e menor				
Legenda	TGO TGP ALP	Significativo = $p < 0.07$					

Figura 8 – comparação estatística entre todos os grupos animais e parâmetros bioquímicos estudados.

4.4 Determinação de Isoniazida e metabólitos em plasma por HPLC

4.4.1 Curva de calibração da isoniazida (INH)

Bolsas de plasma doadas pelo Hemocentro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas foram utilizadas para construção das curvas de calibração.

Uma alíquota de plasma foi enriquecida com solução concentrada de isoniazida para 50ug/mL e a partir desta amostra realizou-se diluições seriadas para a obtenção das concentrações finais de 1; 2,5; 5; 10; 25 e 50 em plasma; em seguida procedeu-se a extração e derivação conforme descrito anteriormente (Figura 1). A curva foi construída com 6 níveis de concentração em triplicata que apresentaram coeficiente de variação inferior a 15%, definido como critério de aceitação. O coeficiente de correlação foi superior a 0,99, adequado para a finalidade analítica proposta (Figura 8).

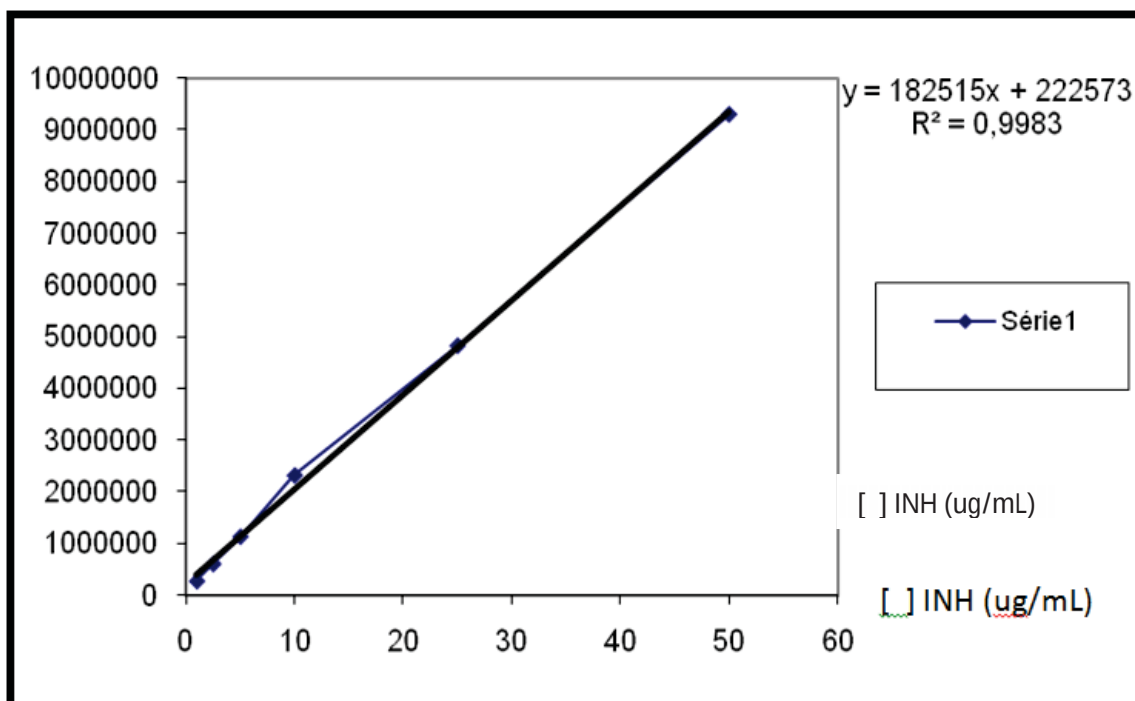


Figura 9 – Curva de Calibração do derivado de Isoniazida de ASC/ [] de INH

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicadas injetadas) do pico do derivado de INH e no eixo das abscissas as concentrações de isoniazida ($\mu\text{g/mL}$).

4.4.2 Curva de calibração da hidrazina (Hz)

Bolsas de plasma doadas pelo Hemocentro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas foram utilizadas para a construção das curvas de calibração.

Alíquotas de plasma, em triplicata, foram enriquecidas com solução concentrada de Hz de 4 $\mu\text{g/mL}$ e então procedeu-se a diluição seriada para as demais concentrações (0,080; 0,200; 0,400; 0,800; 2 e 4 μg por mL de plasma) e procedeu-se a extração e derivação conforme descrito anteriormente (Figura 1). A curva foi construída com 6 níveis de concentração em triplicata que apresentaram coeficiente de variação inferior a 15%, definido como critério de aceitação. O coeficiente de correlação foi superior a 0,99, adequado para a finalidade analítica proposta (Figura 9).

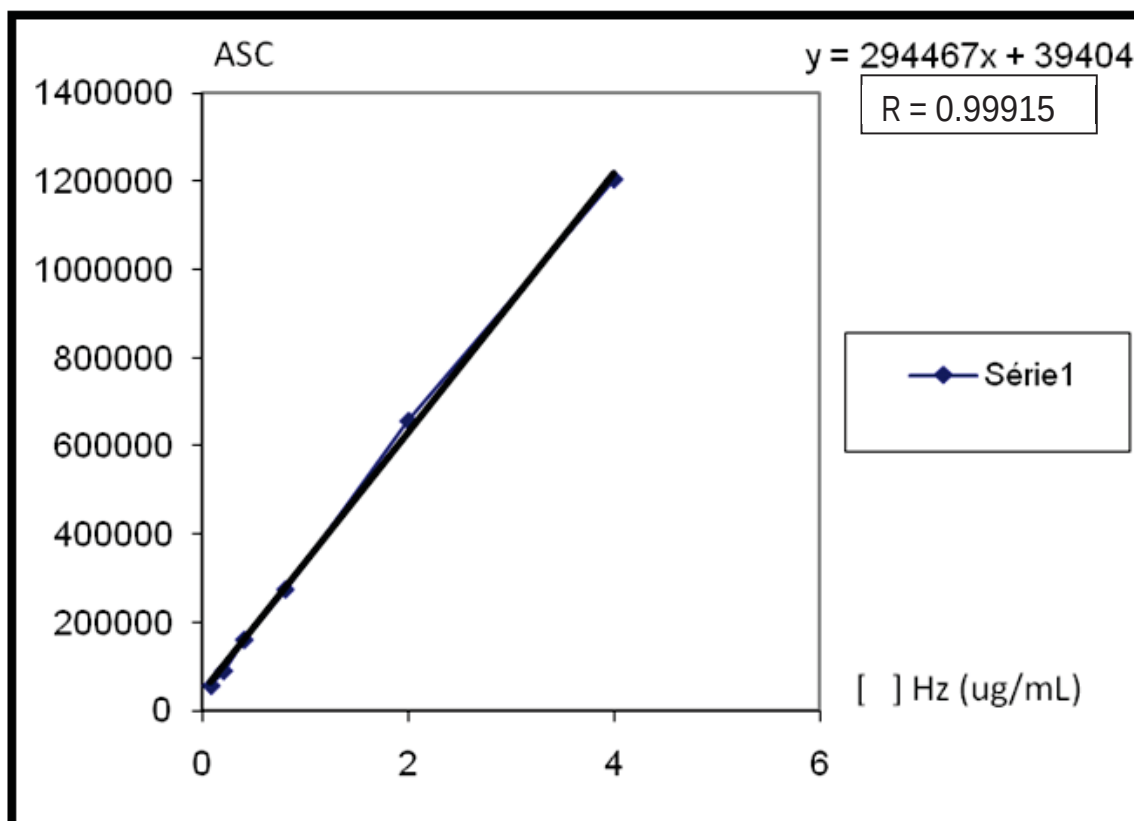


Figura 10 – Curva de Calibração do derivado de Hidrazina de ASC/ [] de Hz

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicadas injetadas) do pico do derivado de Hz e no eixo das abscissas as concentrações de hidrazina ($\mu\text{g/mL}$).

4.4.3 Curva de calibração da acetilisoniazida (AcINH)

Bolsas de plasma doadas pelo Hemocentro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas foram utilizadas para a construção das curvas de calibração.

Alíquotas de plasma foram enriquecidas com solução concentrada de Acetil-isoniazida para $50\mu\text{g/mL}$ e a partir desta solução realizou-se diluições seriadas para as concentrações finais de 1; 2,5; 5; 10; 25 e 50 microgramas por mL em plasma; em seguida procedeu-se a extração e derivação conforme descrito anteriormente (Figura1). A curva foi construída com 6 níveis de concentração em triplicata que apresentaram coeficiente de variação inferior a 15%, definido como critério de aceitação. O coeficiente de correlação foi superior a 0,99, adequado para a finalidade analítica proposta (Figura 10).

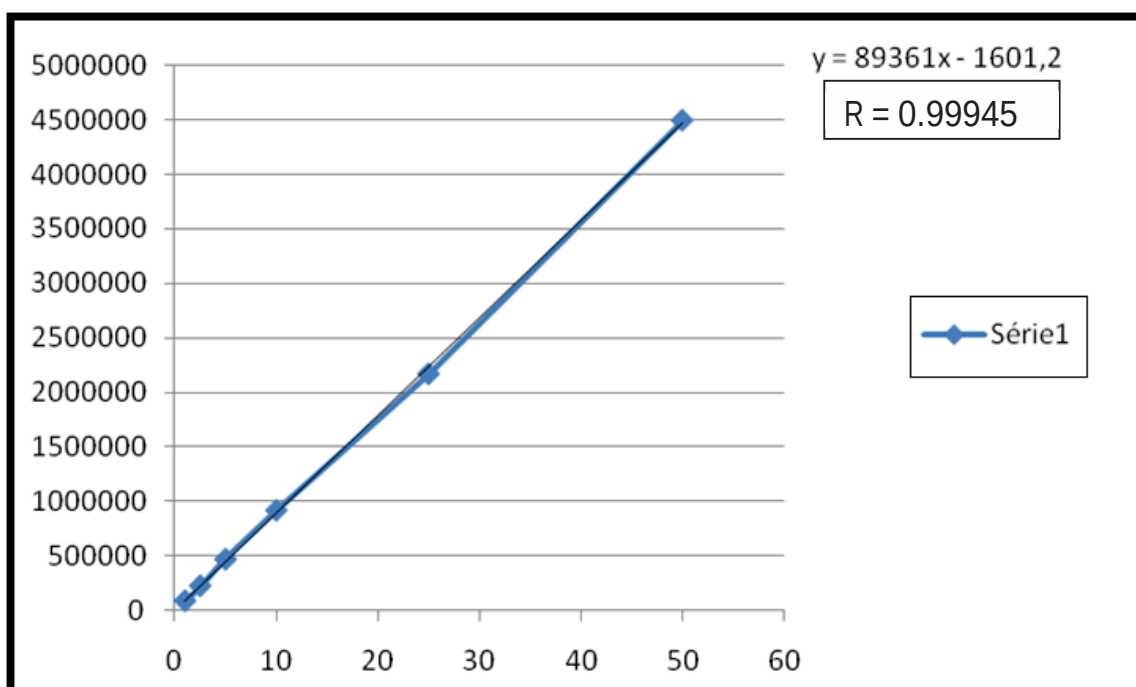


Figura 11 – Curva de Calibração do derivado de Acetilisoniazida de ASC/ [] de AcINH

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicadas injetadas) do pico do derivado de INH e no eixo das abscissas as concentrações de acetilisoniazida ($\mu\text{g/ml}$).

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos nos dois grupos experimentais estão demonstrados na tabela 5 e os perfis de concentração plasmática da INH *versus* tempo estão ilustrados na figura 11.

Tabela 6 - Comparações encontradas entre os parâmetros farmacocinéticos entre os grupos animais.

Parâmetros	Grupo INH	Grupo Associação
Kel (min ⁻¹)	0,087	0,383*
t 1/2 (min)	7,96	1,81*
ASC 0-t (ug/mL.min)	206	106*
ASC 0-inf(ug/mL.min)	307	108*
Cl (mL/min.Kg)	162,6	462,4*
Vd (mL/Kg)	1869,4	1207,3
K alfa (min ⁻¹)	0,73	0,76
t 1/2 alfa	0,949	0,916
Ka (min ⁻¹)	4,851	0,163*
t 1/2 absorção	0,14	4,24*

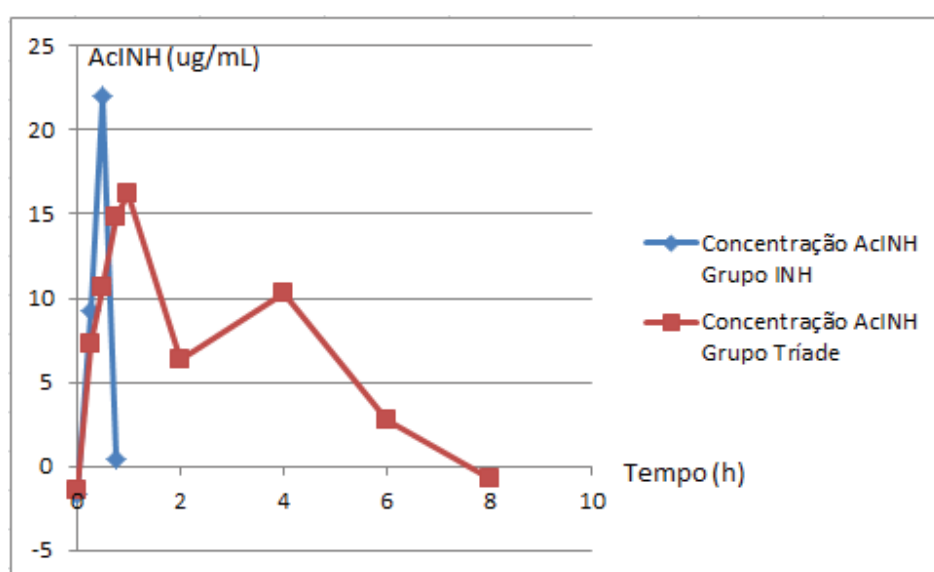


Figura 12- Perfis farmacocinéticos dos grupos estudados

Tabela 7- Parâmetros obtidos da AcINH

Parâmetros da AcINH	INH	Associação
Tmax	30 min	1 hora
Cmax	22ug/mL	16ug/mL
Asc	9,96	38,19

5) Discussão e Conclusão

A isoniazida tem sido associada a efeitos hepatotóxicos, principalmente quando associada à rifampicina no tratamento de tuberculose. O tempo prolongado deste tratamento pode levar à toxicidade severa ao paciente e, caso o mesmo seja mais susceptível, pode até mesmo ocasionar falência hepática levando à necessidade de transplantes para assegurar a sua sobrevivência (Centers for Disease Control and Prevention Report, 2010).

No tratamento da tuberculose existem ainda mais complicações ligadas à resistência da micobactéria a certos antibióticos de primeira linha, como a isoniazida e rifampicina, levando à necessidade do uso de novas associações medicamentosas que podem agravar os efeitos adversos. Desta forma torna-se importante o estudo das associações medicamentosas propostas neste tratamento.

A proposição da introdução da fluoroquinolona Ciprofloxacina como fármaco de primeira escolha no tratamento de tuberculose possui fundamentação *in vitro* (Berning *et al* 2001; De Sousa e Vasconcelos 2005) porém, como visto, a associação tem tanto o potencial de complicar ainda mais o tratamento, como de beneficiar o tratamento devido à mudança do metabolismo da isoniazida, que é fator determinante para a hepatotoxicidade principalmente quando associada à Rifampicina (Srivastava *et al*, 2010).

É sabido que a ciprofloxacina interfere com o Citocromo P450, assim como rifampicina e isoniazida. Desta forma, o uso concomitante destes fármacos pode modificar a sua farmacocinética, e alterações de metabolismo pode levar a diferenças nos efeitos hepatotóxicos induzidos pelos metabólitos da isoniazida.

Os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo são ferramentas amplamente utilizadas para determinar a toxicidade de produtos em animais experimentais, procurando estabelecer relações entre a exposição e o efeito. Estas avaliações podem ser extrapoladas ao homem, desde que feitas as considerações adequadas inter-espécies.

As transaminases são enzimas produzidas principalmente no tecido hepático e que permanecem neste local em grande quantidade com a função de catalisar as reações de transferência de um grupo amino presente em um aminoácido para um alfa-cetoácido com conseqüente produção de outro aminoácido e outro alfa-cetoácido correspondente. (Burtis e Ashwood, 2005)

Estas enzimas são liberadas em grande quantidade na circulação sanguínea quando ocorre destruição do hepatócito e, desta forma, podem ser utilizadas como parâmetros indiretos para a determinação de danos hepáticos.

Níveis elevados de ALT e AST são encontrados em quadros de necrose hepática extensa, como ocorre nas hepatites agudas A ou B, nas exposições a toxinas ou em doses elevadas de acetaminofeno. A esteatose hepática também determina elevações moderadas das transaminases no sangue; o que é comum na exposição crônica ao etanol, nos quadros de diabetes e na obesidade. Alguns

medicamentos podem elevar as transaminases, tais como o ibuprofeno, diclofenaco, fenilbutazona, fenitoína, ácido valpróico, carbamazepina, fenobarbital, sulfonamidas, nitrofurantoína, sinvastatina, amiodarona, quinidina, anti-depressivos tricíclicos, entre outros.

A exposição aos metabólitos da isoniazida também tem sido associada à destruição de hepatócitos com conseqüente aumento sérico das transaminases.

A ALT, também conhecida como TGP(transaminase pirúvica), é uma enzima que catalisa a transaminação da L-alanina para 2-oxoglutarato(2-cetoglutarato) formando piruvato e L-glutamato; o piruvato pode ser usado para a gliconeogênese além de ter papel importante no transporte de nitrogênio entre as células. Esta transaminase é encontrada principalmente no fígado e nos rins, variando de espécie para espécie, claro que por ser importante para todo o metabolismo, encontra-se em menor quantidade em outros tecidos. Embora esta enzima esteja presente nas mitocôndrias celulares, sua grande disponibilidade no citoplasma dos hepatócitos a torna um importante marcador para a investigação de hepatotoxicidade. Quando há danos ao hepatócito inicialmente são liberadas as enzimas do citoplasma destas células e, com a persistência do dano ou em caso de hepatotoxicidade aguda, são liberadas também as enzimas presentes nas mitocôndrias, em menor velocidade (Kaneko e Harvey 2008).

A AST, Aspartato Amino Transferase, também conhecida como TGO, catalisa a transaminação de L-aspartato para 2-oxoglutarato para formar oxalacetato e L-glutamato, com grande importância nos ciclos biológicos.

Esta enzima pode ser usada para a avaliação de várias funções no organismo e não apenas a hepática, devido a sua alta concentração em outros órgãos além do fígado; por isso ela é sempre acompanhada da avaliação da ALT. A AST está presente em grandes quantidades no tecido muscular e cardíaco. Assim, quando ocorre morte celular nestes tecidos há grande aumento desta enzima no plasma sanguíneo.

No caso do aumento de AST, não há métodos simples e diretos para determinar a origem deste fenômeno, portanto utilizam-se outras enzimas para confirmar o diagnóstico. Caso ocorra aumento paralelo de ALT, a origem deve ser hepática; caso o dano seja muscular o marcador CK(creatinina quinase) pode auxiliar na interpretação (Burtis e Ashwood, 2005).

Não se sabe ao certo a meia vida da ALT, porém sabe-se que a sua permanência na circulação é suficiente para que seja a sua atividade seja uma medida confiável na determinação de danos ao fígado. Presume-se que a partir da ocorrência de uma injúria tecidual, os níveis de ALT permaneçam elevados no período de horas a dias. Em cães, a meia vida da ALT foi estimada entre 3 a 60 horas (Kaneko e Harvey, 2008).

Em animais, o uso da ALT como marcador de injúria hepática é controverso. Para alguns animais esta enzima não é tão confiável para este fim, por exemplo, em eqüinos e bovinos a quantidade de ALT por quilograma de fígado é bem menor quando comparada à quantidade presente na musculatura e tecido ósseo. Em canídeos, felinos, leporídeos e outros animais domésticos o aumento

da ALT plasmática é mais específica para danos hepáticos (Kaneko e Harvey, 2008).

Coelhos são modelos animais cuja função hepática é frequentemente analisada através da avaliação destas enzimas. Sarich *et al* (1995) estabeleceram um modelo para avaliação de hepatotoxicidade em coelhos através da combinação de fenobarbital e isoniazida, porém utilizando a enzima Arginino Succinato Liase (ASAL) como marcador de danos hepáticos, já Tayal *et al* (2007) induziram toxicidade a partir da combinação de INH com RMP e, através da avaliação de ALT, quantificaram a extensão de danos hepáticos. Este modelo animal é uma referência melhor do que ratos para a avaliação da toxicidade induzida por RMP e INH, pois reproduz de forma mais confiável e sensível que ratos a indução do citocromo P450 causada por RMP (Shen *et al* 2008).

O equilíbrio entre AST e ALT é importante para a homeostasia do organismo, sendo que em condições fisiológicas, a AST plasmática é maior que a ALT. No caso de algum tipo de injúria do tecido hepático estas enzimas contidas no citoplasma dos hepatócitos são liberadas para a corrente sanguínea e desta forma pode-se avaliar a extensão dos danos de acordo com estas enzimas. No caso de injúria do tecido, as condições fisiológicas são invertidas. A ALT, que é mais específica para o fígado, atinge níveis acima da AST, que é um sinal claro do dano tissular, podendo resultar num diagnóstico de problemas hepáticos (Burtis e Ashwood, 2005).

Embora um resultado clássico de hepatotoxicidade seja o aumento destas enzimas com os níveis de ALT ultrapassando os de AST, algumas

interpretações clínicas podem ser feitas de formas diferentes. O aumento dessas enzimas sem inversão dos níveis das mesmas pode ocorrer no caso de cirrose, hepatite alcoólica e neoplasias. Porém a maior parte das causas de hepatites configura o quadro clássico de disposição destes marcadores. Mesmo assim, as interpretações podem diferir de acordo com a extensão do aumento das transaminases observado.

No caso de necrose hepática, pode-se observar um aumento de até 100 vezes destas enzimas acima do valor de referência, outras patologias geralmente resultam num valor 10 a 40 vezes maior. No caso de hepatotoxicidade causada por Isoniazida e Rifampicina em coelhos, segundo Kalra *et al* (2007), em uma semana de exposição a estes fármacos, observou-se aumento de 3 a 4 vezes os valores de referência para coelhos. O que, segundo Burtis e Ashwood (2005), é esperado pois há apenas um aumento modesto destas enzimas no caso de hepatotoxicidade causado por antibióticos.

Neste experimento a exposição de coelhos albinos a uma dose de isoniazida (50 mg/kg) por 07 dias, assim como à associação, não resultou em elevação do níveis séricos da AST quando comparados aos níveis do grupo controle pré ou pós-exposição (Figura 5). Kalra *et al* (2007), no mesmo modelo animal e protocolo experimental, obtiveram níveis igualmente estáveis de AST na administração de INH isolada, porém quando associada à RMP, estes níveis elevaram-se significativamente.

Os resultados apresentados na figura 3 revelam um aumento estatisticamente relevante da transaminase ALT quando os animais foram

expostos à associação, embora os valores não atinjam os referidos pelos trabalhos anteriormente citados, mas apenas 2 vezes acima do nível basal dos animais. Observamos, conforme descrito anteriormente (figura 5), que a transaminase AST permanece inalterada inclusive no grupo associação. Neste caso, seria esperado também uma alteração num quadro de danos hepáticos, de forma a extrapolar seu nível basal em 3 ou 4 vezes.

Ao mesmo tempo em que a AST não expressa resultado esperado, pode-se observar no panorama geral que a ALT sobrepõe os níveis de AST, o que caracteriza um quadro de hepatite tóxica e sugere que, em menor grau, houve dano aos hepatócitos dos animais.

Este resultado pode ter relação com o fato de que a RMP tende induzir o metabolismo da INH, enquanto que a CIPRO tende a inibir o mesmo processo (Ofoefule 2001 e 2002)e, assim, ocorrendo minimização dos efeitos da associação INH e RMP observada no trabalho de Kalra *et al* (2007) e Tayal *et al*(2007).

A bilirrubina é um pigmento da bile muito importante para diversos aspectos do metabolismo. Este pigmento conjuga-se com fármacos que possuem ciclo êntero-hepático e tem grande função na formação das fezes e absorção de nutrientes. Pode ser encontrado na circulação de duas formas, da forma direta, sem estar conjugada ou da forma indireta que é quando está conjugada com alguma proteína ou molécula, normalmente a albumina. A avaliação de seus níveis plasmáticos é interessante para verificar danos ao fígado geralmente ligados à obstrução do ducto biliar (Kaneko e Harvey, 2008).

A bilirrubina é detectada geralmente pelo método de van der Bergh ou reação Diazo e, neste último, pode diferenciar-se a Bilirrubina direta da bilirrubina total. Isso ocorre porque a bilirrubina não conjugada ou bilirrubina direta é solúvel em água e conjuga-se prontamente ao reagente Diazo (composto por ácido sulfanílico diazotado). Este conjugado é caracterizado pela formação da azobilirrubina vermelha e com a formação desta pode-se realizar a leitura em espectrofotômetro a 525nm.

Para a detecção da bilirrubina total é necessário um reagente chamado acelerador. A bilirrubina conjugada ou indireta não é tão solúvel em água e liga-se bem mais lentamente ao reagente diazo. Desta forma é necessário acrescentar um solvente orgânico para que a reação ocorra e por isso o acelerador, que pode ser etanol ou metanol (Burtis e Ashwood, 2005).

No kit Labtest utilizado(ref. 31), o acelerador é composto por cafeína 130mmol/L, benzoato de sódio 260mmol/L, acetato de sódio 460mmol/L e surfactante. Esta determinação inclui tanto a bilirrubina direta quanto a conjugada, desta forma para determinar a bilirrubina conjugada isolada deve-se subtrair do resultado o valor encontrado na bilirrubina direta.

Em condições fisiológicas a bilirrubina indireta é maior que a direta. Porém estas condições podem inverter-se nos casos agudos de hepatite, onde há o aumento da bilirrubina direta, com exceção de 15% dos casos onde apenas a bilirrubina indireta continua sendo superior (Burtis e Ashwood, 2005). Há aumento da bilirrubina indireta no caso de colestase intrahepática, extrahepática ou obstrução do ducto biliar (Kaneko e Harvey, 2008).

No tratamento tanto de humanos como de animais com INH-RMP, além do dano celular causado pela INH, a RMP *per se* causa uma hiperbilirrubinemia por interferir na excreção desta, além de poder causar necrose centrilobular ligada a colestase (Totsmann *et al*, 2007).

No experimento realizado, como pode ser visualizado na figura 6, mesmo quando INH fora associada à RMP e CIPRO, não houve diferença significativa nos níveis de bilirrubina em nenhuma de suas formas: direta, indireta ou total. Embora os níveis de ALT e AST possam remeter à um quadro de hepatotoxicidade, a bilirrubina não refletiu tal processo. Alguns fatores como o tempo de exposição e o tipo de dano causado podem ter contribuído para que o resultado fosse diferente do esperado no caso de injúria hepática.

Uma vez que, caso houvesse algum tipo de dano ao hepatócito, haveria aumento da bilirrubina total e direta, os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os valores séricos de bilirrubina direta ou indireta do grupo controle e grupo isoniazida, pré ou pós-exposição e, ainda, do grupo associação.

A fosfatase alcalina (ALP) tem ampla ação no organismo, sendo responsável pela hidrólise alcalina de uma grande variedade de substratos orgânicos e sintéticos. A APL pode ser encontrada em vários tecidos, principalmente associada à membranas celulares de mucosas, e especialmente às dos intestinos e túbulos renais. Suas funções variam, desde transporte de lipídeos nos intestinos até o processo de calcificação nos ossos.

Sua atividade depende da ativação por Magnésio, que age como cofator para a enzima, enquanto que os íons borato, fosfato e oxalato são inibidores da enzima. A atividade ótima desta enzima requer um pH alcalino (Burtis e Ashwood, 2005).

Pode ser considerado um marcador de danos hepáticos interessante, embora suas alterações sejam de difícil conclusão se não auxiliado por outros marcadores pelo fato dela ser constitutiva de vários órgãos, principalmente dos ossos, rins, superfície celular dos intestinos e do fígado.

Apesar de ser amplamente distribuída no organismo, a ALP plasmática é originada principalmente dos ossos ou do fígado, sendo que mais da metade da ALP no sangue é proveniente dos ossos. Justamente por isso os valores de referência de ALP podem variar de acordo com a idade do paciente, pois existe relação com a formação óssea do indivíduo.

Quando há danos ao fígado, principalmente de ordem obstrutiva do ducto biliar, os hepatócitos são induzidos a sintetizar mais ALP. Parte desta enzima recém formada vai para o sangue, aumentando seus níveis plasmáticos. No caso de hepatite induzida por drogas, há liberação de ALP na circulação devido ao rompimento de hepatócitos e do aumento da síntese desta enzima pelos hepatócitos íntegros. (Burtis e Ashwood, 2005 p. 608)

Os valores de referência de ALP para coelhos albinos normais é de 60 a 120 U/L, segundo Emmanuelli *et al* (2008). A figura 7, que apresenta as diferenças de ALP nos animais quando submetidos aos diferentes protocolos propostos,

demonstra que não houve diferença estatística significativa de ALP nas exposições realizadas, no entanto os valores obtidos revelam uma tendência ao aumento no grupo pós-controle, uma tendência à diminuição no grupo da INH e uma diminuição menos significativa no grupo da associação.

Durante a execução dos protocolos dos grupos INH e associação observou-se uma queda na ingestão de alimento, sendo mais intensa no primeiro, com consequente perda considerável de peso que provavelmente se relacionou ao efeito anorexígeno da INH e que pode estar relacionado com a tendência de diminuição da ALP. Banerjee *et al*(1976) constataram que a queda da ALP pode ocorrer em decorrência de diminuição da ingestão de alimento por tempo prolongado.

Por outro lado, observou-se que no grupo pós controle há uma tendência ao aumento da ALP, o que provavelmente relacionou-se ao estresse sofrido pelo animal durante a semana de administração ou, ainda, à irritação de mucosas pela passagem da sonda nasogástrica.

Foi interessante observar que no grupo INH, onde as concentrações plasmáticas de INH foram superiores, houve drástica diminuição da atividade de ALP , e na associação, onde as concentrações plasmáticas de INH foram inferiores, houve diminuição menos significativa da atividade da ALP. Ainda, ressalte-se que no grupo controle, onde não houve administração de INH, a atividade de ALP foi aumentada, o que pode significar que nos grupos onde houve administração do fármaco, o efeito do estresse e de irritação da mucosa

contrapôs-se ao efeito de diminuição da ALP, tornando-o menos significativo com consequências sobre a comparação estatística.

Ofoefule *et al* (2002, 2001) constataram que a ciprofloxacina, tanto quando administrada concomitantemente com isoniazida, quanto com rifampicina, leva à diferenças no perfil farmacocinético da INH em voluntários sadios. No entanto, esta interação farmacocinética não tem implicado em alterações no regime posológico. A ocorrência de modificações no perfil de toxicidade é desconhecida, e este aspecto pode inviabilizar a associação.

A proposta deste estudo foi associar os três fármacos e estudar se esta associação causaria alterações sobre farmacocinética da INH e com conseqüentes modificações no perfil toxicológico do produto em coelhos. Portanto foi proposto o estudo da farmacocinética da isoniazida e a quantificação de seus metabólitos segundo o método desenvolvido por De Rosa *et al* (2007). O método foi parcialmente validado gerando as curvas expressas pelas figuras 8 a 10, confirmando que os limites de confiança do método permaneceram adequados para a sua aplicação no estudo de farmacocinética.

Os resultados da avaliação farmacocinética (Figura 11) demonstraram que as concentrações plasmáticas da INH no intervalo de doses foi significativamente menor quando houve associação de fármacos, o que sugere interações na fase de absorção ou eliminação do produto.

Na tabela 7 estão relacionados os parâmetros farmacocinéticos da INH nos dois grupos estudados e constatou-se diferenças estatísticas entre vários parâmetros farmacocinéticos.

A constante de eliminação (k_{el}) apresentou diferenças significativas e foi maior no grupo da associação. A constante de eliminação reflete a velocidade em que este processo ocorre e está intimamente relacionada à meia vida de eliminação do fármaco. Assim, o aumento de k_{el} provavelmente relaciona-se ao aumento do metabolismo da isoniazida induzido pelos fármacos associados, com conseqüências sobre a meia vida de eliminação.

A meia vida de eliminação, por sua vez, é um parâmetro híbrido, dependente do Clearance e do Volume de Distribuição; de tal forma que aumentos no clearance tendem a diminuir a meia vida, uma vez que o Cl representa a taxa de eliminação do fármaco do sangue, enquanto que aumentos no V_d tendem a elevar a meia vida, pois o fármaco se distribui mais profundamente nos compartimentos e em maior extensão o que dificulta a excreção da INH.

O Clearance foi um parâmetro que também sofreu influência do aumento no metabolismo da INH, e apresentou valores superiores no grupo da associação de forma relevante ($p < 0,05$). Pode-se atribuir o aumento do Clearance à indução de enzimas do Citocromo P450 pela exposição continuada ao fármaco Rifampicina, especialmente as espécies envolvidas no metabolismo da isoniazida, no caso majoritariamente a CYP 2E1, o aumento do metabolismo da INH contribui com o processo de eliminação da INH do organismo e, portanto, aumentando o Cl.

Em contrapartida, no parâmetro V_d não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Supostamente este parâmetro somente estaria significativamente modificado se houvesse competição pelos sítios de ligação às proteínas plasmáticas e os resultados obtidos demonstram que este fato não ocorreu. Ainda, a constante de distribuição (K_{df}) também não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

A diminuição observada na meia vida de eliminação para o grupo da associação, portanto, demonstra a influencia das alterações decorrentes da indução do metabolismo da INH e expressas pelo aumento do CI neste grupo.

A área sob a curva (ASC) também teve uma significativa diminuição no grupo cujo metabolismo da isoniazida foi aumentado. É um evento esperado devido ao efeito da associação. Além do aumento do CI, a diminuição da ASC relaciona-se à diminuição da k_a com conseqüente aumento da meia vida de absorção.

A ciprofloxacina leva à inibição da atividade colinérgica, que por sua vez causa diminuição da motilidade gastrointestinal e retardo no esvaziamento gástrico, diminuindo a velocidade de absorção de outros fármacos (Ofoefule *et al*, 2001). O reflexo deste efeito é o aumento da meia vida de absorção e diminuição da constante de absorção, observadas neste trabalho.

Por absorver mais lentamente, a amplitude do C_{max} é diminuída, contribuindo para a diminuição da ASC em relação a ASC do grupo INH. Este fator somado ao valor de clearance aumentado, no grupo da associação, leva ao

aparecimento de concentrações plasmáticas menores. Este aspecto revela que, nesta associação medicamentosa, o resultado global é a manutenção de concentrações plasmáticas menores de INH que declinam com maior velocidade quando comparada a administração da INH isoladamente.

Os metabólitos acetil-hidrazina e hidrazina não foram detectados nas amostras analisadas, embora o método bioanalítico tenha sido satisfatoriamente aplicado em estudo anterior com ratos wistar. Este fato reforça que o perfil metabólico do rato wistar é significativamente diferente do coelho albino e reflete-se nas diferenças significativas com relação à hepatotoxicidade da INH entre as duas espécies.

Foi possível detectar a acetil-isoniazida no grupo da INH isolada até 45 minutos após administração, e no grupo da associação foi possível quantificá-la no período de 8 horas após a administração. Este metabólito demonstrou diferenças de perfil entre os grupos INH e associação como pode ser visto na tabela 8. Os valores de Cmax foram superiores no grupo da INH isolada, porém foi possível observar que o metabólito apresentou ASC superior na associação, pois as concentrações plasmáticas foram mantidas por um tempo prolongado. Este fato pode estar relacionado às diferenças no processo de absorção entre os grupos, já discutido anteriormente. Assim a INH, no grupo da associação, foi absorvida mais lentamente com conseqüente menor velocidade de formação de metabólitos. Esta característica pode ser vantajosa na terapêutica, considerando-se a provável relação entre exposição ao metabólito e hepatotoxicidade.

Ressalte-se o valor da concentração máxima de AcINH no grupo INH ocorreu 30 minutos após a administração e atingiu uma amplitude de 22µg/mL; o valor de C_{max} de AcINH no grupo associação ocorreu 1 hora após a administração e atingiu 16µg/mL (tabela 8).

Assim, foi possível observar que a associação de INH com RMP e CIPRO resulta em interações farmacocinéticas com conseqüentes modificações nos níveis plasmáticos da INH e acetil-isoniazida e estas interações podem estar relacionadas às diferenças encontradas nos valores de ALT e ALP entre os grupos. Todos os resultados apontam para prováveis benefícios desta associação na terapêutica, no entanto, somente a inclusão de um grupo de animais expostos a uma associação INH e RMP pode fundamentar esta conclusão.

6) Referências bibliográficas

1. ACOCELLA G, LUVARÁ A, GUAGLIANONE M. Rifampicin and the liver. *Lancet*. V.1, N.2, P.45. 1978.
2. ATTRI S, RANA SV, VAIPHEI K, SODHI CP, KATYAL R, GOEL RC, NAIN CK, SINGH K. Isoniazid- and rifampicin-induced oxidative hepatic injury-- protection by N-acetylcysteine. *Hum Exp Toxicol*. V.19, N.9, P.517-522, 2000.
3. BANERJEE BN, SOFIA RD, ERIKSON D, IVINS NJ. Toxicity of delta9 - tetrahydrocannabinol (THC) administered subcutaneously for 13 days to female rabbits. *J Toxicol Environ Health*. V.1, N.5, P.769-76, 1976
4. BARRIERE SL, KAATZ GW, SEO SM. Enhanced elimination of ciprofloxacin after multiple-dose administration of rifampin to rabbits. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, V.33, N.4, P.589-590. 1989
5. BERNING SE. The role of fluoroquinolones in tuberculosis today. *Drugs*. V.61, N.1, P.9-18. 2001.
6. BROUWERS EE, SÖHNE M, KUIPERS S, VAN GORP EC, SCHELLENS JH, KOKS CH, BEIJNEN JH, HUITEMA AD. Ciprofloxacin strongly inhibits clozapine metabolism: two case reports. *Clin Drug Investig*. V.29 N.1, P. 59-63, 2009.
7. BURTIS C, ASHWOOD E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. V. 5, P. 1091, 2005.
8. BURTIS C, ASHWOOD E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. V. 5, P. 608, 2005.

9. DE ROSA HJ, BALDAN HM, BRUNETTI IL, XIMENES VF, MACHADO RGP. The effect of pyrazinamide and rifampicin on isoniazid metabolism in rats. *Biopharm Drug Dispos.* V.28, N.6, P.291-296, 2007.
10. DE SOUZA MVN E VASCONCELOS TRA. Fármacos No Combate À Tuberculose: Passado, Presente E Futuro *Quim. Nova*, V. 28, N. 4, P. 678-682, 2005
11. Di PERRI G, BONORA S. Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* V. 54 P.593–602, 2004.
12. DOUGLAS JG, MCLEOD MJ. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. *Clin Pharmacokinet.* v. 37, n. 2, p. 127-146, 1999.
13. ELLENHORN MJ, BARCELOUX DG. *Medical toxicology.* New York: Elsevier p. 367-372. 1988
14. EMANUELLI MP, LOPES STA, MACIEL RM, GARMATZ BC, TAVARES MO. Concentração Sérica de Fosfatase Alcalina, Gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Ciência Animal Brasileira.* V.9, N.1, P. 251-5, 2008.
15. EMINZADE S, URAZ F, IZZETTIN FV. SILYMARIN protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutr Metab (Lond).* V.5, N.5, P.18, 2008.
16. FERREIRA SMB, DA SILVA AMC, BOTELHO C. Abandono do tratamento da tuberculose pulmonar em Cuiabá MT. *Brasil J Bras Pneumol.* V.31, N.5, P.427-435, 2005.

- 17.HARDMAN JG, LIMBIRD LE. *GOODMAN & GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill. P. 955-961, 2004.
- 18.JAIN SP, AGNIHOTRI, KRISHAN K, SHARMA, SHIKHA GUPTA AND PAWAN GUPTA N.K. Extensively drug resistance (XDR) TB is not always fatal. *Indian J Tuberc*. V.56, P.48-50, 2009
- 19.KANECO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, V.6, P.388-400, 2008
- 20.KALRA BS, AGGARWAL S, KHURANA N, GUPTA U. Effect of cimetidine on hepatotoxicity induced by isoniazid-rifampicin combination in rabbits. *Chem Biol Interact*. V.26, N.1, P.18-21, 2007.
- 21.KASHUBA ADM, BERTINO JS, KEARNS GL, LEEDER S, JAMES, A.; GOTSCHALL, R, NAFZIGGER, A. Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. *Clin Pharmacol Ther*. V. 63, N. 5, P. 540-551, 1998.
- 22.OFOEFULE SI, OBODO CE, ORISAKWE OE, AFONNE JO, ILONDU NA, AGBASI PU, ANUSIEM CA, MADUKA SO, ILO CE. Salivary and urinary excretion and plasma-saliva concentration ratios of isoniazid in the presence of Co-administered ciprofloxacin. *Am J Ther* V.9, N.1, P.15-18, 2002.
- 23.OFOEFULE SI, OBODO CE, ORISAKWE OE, ILONDU NA, AFONNE OJ, MADUKA SO, ANUSIEM CA, AGBASI PU. Some plasma pharmacokinetic

- parameters of isoniazid in the presence of a fluoroquinolone antibacterial agent *Am J Ther.* V.8 N.4, P.243-246, 2001.
24. PELOQUIN CA, JARESCO GS, YONG C, KEUNG ACF, BULPITT AE, JELLIFFE RW. Population pharmacokinetic modeling of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother* - V. 41, N. 12, P. 2670-2679 - 1997.
 25. PETERSON JW, COMER JE, NOFFSINGER DM, WENGLIKOWSKI A, WALBERG KG, CHATUEV BM, CHOPRA AK, STANBERRY LR, KANG AS, SCHOLZ WW, SIRCAR J. Human monoclonal anti-protective antigen antibody completely protects rabbits and is synergistic with ciprofloxacin in protecting mice and guinea pigs against inhalation anthrax. *Infect Immun.* V.74, N.2, P.1016-1024, 2006.
 26. ROSSETTIA MLR, VALIMB ARM, SILVAA MSN, RODRIGUES VS. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev Saúde Pública.* V.36, N.4, P.525-532, 2002.
 27. SARICH TC, ADAMS SP, PETRICCA G, WRIGHT JM. Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* V.28 N.2, P.695-702. 1999.
 28. SARICH TC, ZHOU T, ADAMS SP, BAIN AI, WALL RA, WRIGHT JM. A model of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits. *J Pharmacol Toxicol Methods.* V.34, N.2, P.109-116, 1995.
 29. SEIFART HI, GENT WL, PARKIN DP, VAN JAARSVELD PP, DONALD PR. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid,

- acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids. *J Chromatogr B Biomed.* V.15, N.674(2), P.269-275. 1995.
30. SHEN C., MENG Q, ZHANG G. HU W. Rifampicin exacerbates isoniazid-induced toxicity in human but not in rat hepatocytes in tissue-like cultures. *British Journal of Pharmacology* V.153, P.784–791, 2008.
31. SMITH J, TYRELL WF, GOW A, ALLAN GW, LEES AW. Hepatotoxicity in rifampin-isoniazid treated patients related to their rate of isoniazid inactivation. *Chest.* V.61, N.6, P.587-588, 1972.
32. SRIVASTAVA A, MAGGS JL, ANTOINE DJ, WILLIAMS DP, SMITH DA, PARK BK. Role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity. *Handb Exp Pharmacol.* N.196, P.165-94, 2010.
33. TASDUQ SA, KAISAR P, GUPTA DK, KAPAH B, MAHESHWARI HS, JYOTSNA S, JOHRI RK. Protective effect of a 50% hydroalcoholic fruit extract of *Emblica officinalis* against anti-tuberculosis drugs induced liver toxicity. *Phytother Res.* V.19, N.3, P.193-197, 2005.
34. TAYAL V, KALRA BS, AGARWAL S, KHURANA N, GUPTA U. Hepatoprotective effect of tocopherol against isoniazid and rifampicin induced hepatotoxicity in albino rabbits. *Indian J Exp Biol.* V.45, N.12, P.1031-1036, 2007.
35. TOSTMANN A, BOEREE MJ, AARNOUTSE RE, DE LANGE WC, VAN DER VEN AJ, DEKHUIJZEN R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 V.23, N.2, P.192-202, 2007.

- 36.VIEIRA DE, GOMES M. Adverse effects of tuberculosis treatment: experience at an outpatient clinic of a teaching hospital in the city of São Paulo, *Brazil. J Bras Pneumol.* V.34, N.12 P.1049-1055, 2008.
- 37.WHO REPORT 2009: Global Tuberculosis Control EPIDEMIOLOGY, STRATEGY, FINANCING. P. 12. 2009
- 38.Y BHUSAL , CM SHIOHIRA, N YAMANE. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* V.26, P.292–297, 2005.
- 39.ZHOU S, YUNG CHAN S, CHER GOH B, CHAN E, DUAN W, HUANG M, MCLEOD HL. Clin Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Pharmacokinet.* V.44 N.3, P.279-304, 2005.