

Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado  
de la Facultad de Farmacia de Barcelona \*

Unidad de Farmacología Clínica del Hospital de Ntra. Sra. del Mar (Barcelona) \*\*

## Determinación analítica del fenotipo acetilador utilizando como fármaco isoniazida. Estudio de una población pediátrica <sup>1</sup>

por J. Boatella \*, J. Camí \*\*, N. González \* y M. C. De la Torre \*

### R E S U M E N

Se describe un método para clasificar a los individuos como acetiladores rápidos o lentos de la isoniazida. Se recoge la orina entre la 6.ª y la 8.ª hora siguientes a la administración, por V.O., de 10 mg de isoniazida/kg peso. En una alícuota de esta muestra, se determina, únicamente, acetilisoniazida y, en la otra, se determinan tanto la acetilisoniazida como la isoniazida acetilada artificialmente (hidrazinas totales), mediante la misma reacción colorimétrica. La clasificación en acetiladores rápidos y lentos se basa en el porcentaje acetilisoniazida/hidrazinas totales.

### S U M M A R Y

A method is described for classifying subjects as slow or rapid acetylators of isoniazid. Urine is collected in the 6 to 8 hr period following an oral test dose of 10 mg of isoniazid/kg body weight. In one aliquot of this sample only acetylisoniazid is determined, in the other acetylisoniazid and isoniazid artificially acetylated (total hydrazines) are estimated by the same color reaction. The classification of slow and fast acetylators is based on the percentage of acetylisoniazide versus the total hydrazines.

### INTRODUCCION

La existencia de grandes diferencias interindividuales en la respuesta a dosis idénticas del mismo fármaco es un fenómeno bien conocido. El principal factor que contribuye a estas diferencias en la respuesta terapéutica, es una marcada variación en la capacidad metabolizadora de los individuos. Dicha capacidad, se ha demostrado que

está determinada por factores ambientales, edad, dieta, estado de salud, coadministración de otros fármacos, factores hormonales y factores genéticos (1).

Para distinguir entre la contribución de los factores ambientales y genéticos en la variabilidad metabólica se realizan estudios poblacionales y étnicos (indican la posible existencia de diferencias raciales).

La distribución de frecuencias del parámetro investigado, indica si un determinado factor es heredado monogénicamente (herencia mendeliana) o si se trata de una herencia poligénica. En el caso de la herencia monogénica, el histograma de distribución de frecuencias es bi o trimodal, mientras que en el caso de la herencia poligénica es unimodal (gaussiana).

Entre los polimorfismos metabólicos controlados monogénicamente, cabe destacar:

- Polimorfismo acetilador
- Polimorfismo oxidativo (2,3)

Diversos fármacos del tipo de las aminas e hidrazinas aromáticas son metabolizadas en el hombre por N-acetilación. La reacción de acetilación está mediada por un enzima hepático, la N-acetiltransferasa, y es necesaria la colaboración del acetyl-CoA. Dicha reacción tiene lugar en dos pasos:

- 1)  $N\text{-acetiltransferasa} + \text{Acetil-CoA} \rightleftharpoons \text{Acetil-N-acetiltransferasa} + \text{CoA}$
- 2)  $\text{Acetil-N-acetiltransferasa} + \text{R-NH}_2 \rightleftharpoons \text{N-acetiltransferasa} + \text{R-NH-CO-CH}_3$

Según la velocidad con que se realiza esta reacción los individuos pueden clasificarse como acetiladores rápidos o lentos del fármaco estudiado.

El fenotipo acetilador es una característica predeterminada genéticamente a través de un polimorfismo mende-

<sup>1</sup> Recibido el día 15 de enero de 1983.

liano. En el fenotipo acetilador no influyen ni la edad ni el sexo, pero sí la raza (5).

Los acetiladores lentos son homocigotos para un gen autosómico recesivo, mientras que los rápidos son homo o heterocigotos para un gen autosómico dominante.

Entre los fármacos (4) que están sujetos a este polimorfismo acetilador destacan los siguientes: isoniazida, hidralazina, procainamida, dapsona, fenelzina, nitrazepam, algunas sulfonamidas y la monoacetilhidrazina (metabolito inactivo de la isoniazida).

La determinación analítica del fenotipo acetilador es interesante ya que tiene importantes implicaciones terapéuticas en el caso del tratamiento de la tuberculosis pulmonar con isoniazida. Se sabe que según sea el fenotipo acetilador del individuo existe una distinta incidencia en cuanto al riesgo de aparición de efectos secundarios indeseables del tipo de la hepatotoxicidad (10,11), neuritis periférica (12,13,14), así como una distinta respuesta a tratamientos intermitentes (una o dos dosis/semana) (4).

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. DETERMINACION DEL FENOTIPO ACETILADOR UTILIZANDO COMO FARMACO SULFADIMIDINA

La sulfadimidina (sulfametazina) es una sulfonamida de acción rápida que se utiliza en el tratamiento de las infecciones sistémicas. Se absorbe rápidamente, tras su administración oral, a nivel del tracto gastrointestinal. Se une a la albúmina en un porcentaje que oscila entre el 60 y el 80 % (6) y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y la placenta.

Su metabolismo está sujeto a polimorfismo acetilador y ha sido el fármaco, tradicionalmente, utilizado para llevar a cabo la determinación del fenotipo acetilador del individuo.

#### 1.1. Dosis de fármaco administrada y condiciones de administración

A un individuo que haya estado libre de cualquier tipo de medicación en las 48 horas anteriores a la realización de la prueba, se le administran, por V.O., 10 mg de sulfadimidina/kg peso. A las 5 horas de la ingestión del fármaco el individuo debe vaciar completamente la vejiga, despreciándose esta orina. La muestra que se llevará al laboratorio será la orina recogida entre la 5.ª y la 6.ª hora siguientes a la administración de la sulfadimidina. La muestra debe conservarse en la nevera hasta que se realice el análisis.

#### 1.2. Reactivos y material

- Acido clorhídrico 6 N
- Solución acuosa de nitrito sódico al 0.1 %
- Solución acuosa de sulfamato amónico al 0.8 %
- Solución acuosa de diclorhidrato de alfa-naftilendiamina al 0.8 %

La solución deberá conservarse a 4°C y al abrigo de la luz; en estas condiciones la solución es estable durante 15 días.

### 1.3. Métodos

La técnica analítica utilizada para realizar la determinación del fenotipo acetilador es una colorimetría y el método es el de Schröder (15).

Para el estudio se han utilizado dos poblaciones distintas: una población pediátrica (Hospital de Nuestra Señora del Mar, Barcelona) y una estudiantil (estudiante de 3.º de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona).

El modo operatorio es el siguiente:

- 1: En un tubo A se depositan 10 µl de la muestra de orina, se añade 1 ml de ácido clorhídrico 6 N y se calienta a 80°C durante 5 minutos. Con este tratamiento se consigue hidrolizar la acetilsulfadimidina y, de esta forma, tener toda la sulfadimidina en forma libre.
- 2: En un tubo B se depositan 50 µl de la muestra de orina y se añade 1 ml de ácido clorhídrico 6 N, pero no se calienta. Este paso se realiza inmediatamente después de finalizada la hidrólisis que se ha llevado a cabo en el tubo A.
- 3: A ambos tubos se adiciona 1 ml de nitrito sódico al 0.1 % y se agita durante 2 minutos.
- 4: A los dos tubos se añade 1 ml de sulfamato amónico al 0.8 %.
- 5: Se añade a ambos tubos 1 ml de diclorhidrato de alfa-naftilendiamina al 0.8 %.

Se verifica una reacción de diazoación. El compuesto coloreado que se forma presenta una coloración que va desde el rosa al violáceo.

Si la intensidad del color es mayor en el tubo A que en el tubo B el individuo es clasificado como acetilador rápido y si es mayor en el tubo B como acetilador lento. La determinación puede realizarse a simple vista o mediante un colorímetro o espectrofotómetro, leyendo la absorbancia al máximo de absorción de 500 nm.

### 1.4. Resultados

El número de muestras de orina analizadas ha sido de 78. De éstas 16 corresponden a población pediátrica y 62 a población estudiantil.

Las muestras facilitadas por la Unidad de Pediatría del Hospital de Nuestra Señora del Mar, correspondían a niños que presentaban una primoinfección tuberculosa. Todos ellos fueron fenotipados como acetiladores lentos. De los 62 estudiantes de Medicina de la U.A.B., que fueron fenotipados, únicamente 2 eran acetiladores rápidos y los 60 restantes lentos. El porcentaje de acetiladores rápidos en la población estudiantil analizada es de un 3.22 %.

## 2. DETERMINACION DEL FENOTIPO ACETILADOR UTILIZANDO COMO FARMACO ISONIAZIDA

La isoniazida es un antituberculoso que, actualmente, forma parte de la mayoría de combinaciones terapéuticas utilizadas en el tratamiento y quimioprofilaxis de la tuberculosis.

La isoniazida es rápidamente absorbida, tras su administración por V.O., a nivel del tracto gastrointestinal. No se une a proteínas plasmáticas y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y la placenta. Las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo son, aproximadamente, el 20 % de las plasmáticas (7) y en la leche materna la concentración es la misma que en el plasma (8). Es metabolizada en el hígado, principalmente, mediante un proceso de acetilación. En los acetiladores lentos una vía importante de metabolización es la hidrólisis directa de la isoniazida para dar ácido isonicotínico e hidrazina. En los acetiladores rápidos el ácido isonicotínico proviene de la hidrólisis de la acetilisoniazida. El esquema del metabolismo de la isoniazida se muestra en la figura 1.

Debido a la elevada incidencia de las primoinfecciones tuberculosas en nuestra comunidad y a que éstas son tratadas con isoniazida, se ha considerado preferible utilizar este fármaco, en lugar de la sulfadimidina, para determinar el fenotipo acetilador de los pacientes.

El estudio se ha llevado a cabo en una población pediátrica (Hospital de Nuestra Señora del Mar).

### 2.1. Forma farmacéutica, dosis administrada y toma de muestras

La isoniazida se ha administrado bajo la forma farmacéutica de cápsulas de gelatina dura. Las cápsulas contenían, como principio activo, únicamente isoniazida y como excipiente, lactosa.

La dosis que se administra es de 10 mg/kg peso y la vía de administración es la oral. Es necesario que el individuo haya estado libre de cualquier tipo de medicación en las 48 h anteriores a la realización del test. La muestra de orina se recoge entre la 6.<sup>a</sup> y la 8.<sup>a</sup> horas siguientes a la administración de la isoniazida. La orina anterior a la 6.<sup>a</sup> hora debe despreciarse. Una vez recogida la muestra, ésta deberá conservarse en la nevera.

### 2.2. Reactivos y material

- Espectrofotómetro. Se ha utilizado un aparato Vitatron, modelo MPS, tipo 940.320.
- Solución de Cloramina-T al 12.5 % en alcohol del 50 %. La solución debe conservarse en la oscuridad y a 4° C, en estas condiciones es estable durante 7 días.
- Solución acuosa de KCN al 20 %. La solución debe conservarse a 4° C.
- Solución reguladora de pH = 6. Se disuelven 43.54 g de fosfato bipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) en agua y se completa el volumen hasta 500 ml (sol. A). Por otro lado se disuelven 34.02 g de fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en agua y se diluye hasta 500 ml (sol. B). Para preparar la solución reguladora se mezclan 12.3 ml de la solución A con 87.7 ml de la solución B. El pH se ajusta a 6.0 con cualquiera de las dos soluciones.
- Anhídrido acético destilado.
- Ácido clorhídrico 0.5 N.
- Hidróxido sódico 0.5 N.
- Hidróxido sódico 7 N.

### 2.3. Método

La técnica analítica escogida es una colorimetría y el método es el de Eidus y Hodgkin (16).

#### Modo operacional:

- 1: Se centrifugarán 10 ml de orina a 2.500 rpm durante 10 minutos.
- 2: Se transfieren 4 ml del sobrenadante anterior a un tubo de ensayo.
- 3: Se añaden 2 ml de ácido clorhídrico 0.5 N, se agita y se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos. Con este tratamiento se consigue romper las hidrazonas formadas entre la isoniazida y los ácidos pirúvico y alfa-cetoglutárico, con lo que toda la isoniazida queda en forma libre.

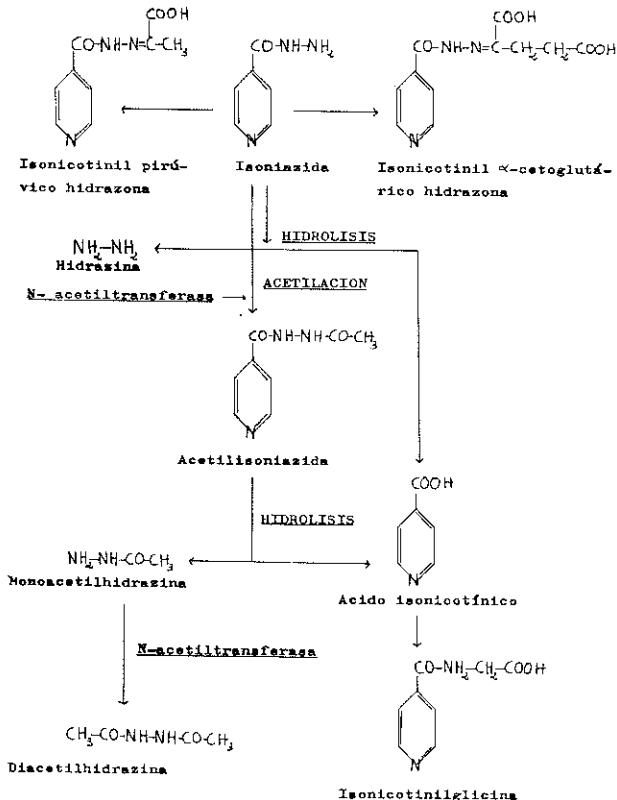


Figura 1

Metabolismo de la isoniazida en el hombre (4).

- 4: De la orina acidificada se toman dos alícuotas de 1,5 ml cada una, que se transfieren a dos tubos de ensayo rotulados con las letras A y B.
- 5: Al tubo B se añaden 50  $\mu$ l de anhídrido acético y se agita durante 1 minuto.  
De este modo se ha acetilado toda la isoniazida que estaba libre. Transcurrido un minuto, se añaden 50  $\mu$ l de hidróxido sódico 7 N con objeto de neutralizar la acidez proporcionada por el anhídrido acético
- 6: Al tubo A se añaden 100  $\mu$ l de agua destilada con objeto de mantener el mismo volumen en los dos tubos.
- 7: Se adiciona, a ambos tubos, 0,5 ml de hidróxido sódico 0,5 N y se agita suavemente. El hidróxido sódico neutraliza la acidez producida por el ácido añadido inicialmente.
- 8: Se diluyen ambas alícuotas con 8 ml de agua destilada (1:10).
- 9: Se transfieren 2 ml de las alícuotas diluidas a 2 tubos de ensayo rotulados, asimismo, con las letras A y B.  
A un tercer tubo de ensayo se añaden 2 ml de agua destilada y éste se utilizará como blanco.
- 10: A ambos tubos se añaden 1 ml de solución reguladora de pH = 6 a base de fosfatos, 1 ml de cianuro potásico al 20 % y 4 ml de cloramina-T al 12,5 %. Se agita durante 1 minuto.
- 11: Se determinan las absorbancias de las soluciones A y B a 550 nm, utilizando como blanco el agua destilada.

Para fenotipar a los individuos se determina el porcentaje de acetilación mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AC — INH} = \frac{\text{Aa}}{\text{Ab}} \times 100$$

% AC — INH = Porcentaje de acetilación.

Aa = Absorbancia de la contenida en el tubo A (únicamente contiene isoniazida acetilada «in vivo»).

Ab = Absorbancia de la solución contenida en el tubo B (contiene acetilisoniazida e isoniazida acetilada «in vivo»).

#### 2.4. Recta del calibrado

Para poder realizar la recta de calibrado se procedió a sintetizar la acetilisoniazida y el método utilizado fue el de Fox y Gibas (17).

Se prepara una solución patrón de acetilisoniazida en agua, de concentración igual a 100  $\mu$ g/ml. A partir de esta solución patrón se realizan diluciones seriadas: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.

A cada solución se añaden 1 ml de solución reguladora de pH = 6, 1 ml de KCN al 20 % y 4 ml de cloramina-T al 12,5 %, determinándose la absorbancia al máximo de absorción de 550 nm.

La ecuación de la recta de regresión obtenida es:

$$y = 3.417 \cdot 10^{-4} x + 3.4 \cdot 10^{-3}$$

$$r = 0.9985$$

### 3. DETERMINACION DEL FENOTIPO ACETILADOR MEDIANTE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

Para verificar los resultados obtenidos con la técnica colorimétrica, anteriormente descrita, se eligió la C.L.A.E.

#### 3.1. Material y reactivos

- Cromatógrafo Perkin-Elmer, serie 3. El detector es un espectrofotómetro de longitud de onda variable Perkin-Elmer LC 558, con registrador de la misma marca, modelo 561.
- Columna de octadecilsilano (Lichrosorb<sup>®</sup> RP-18, Merck), con un diámetro de partícula de 10  $\mu$ m.
- Metanol
- Solución reguladora de pH acético-acetato de pH = 4
- Dioctilsulfosuccinato sódico.

#### 3.2. Condiciones de trabajo

El eluyente utilizado está constituido por 25 % de metanol y 75 % de solución reguladora de pH acético-acetato de pH = 4. El flujo es de 2 ml/min. El volumen inyectado es de 10  $\mu$ l. La longitud de onda 265 nm y la sensibilidad a la que se trabaja de 0.05.

#### 3.3. Método

La muestra no necesita ser previamente desproteinizada y se somete al mismo tratamiento descrito para la técnica colorimétrica, exceptuando la adición de los reactivos de coloración.

La extracción se realiza mediante los cartuchos SEP-PAK<sup>®</sup> C-18. Para activar dichos cartuchos se pasan por los mismos: 4 ml metanol; 4 ml D.O.S.S.S. (dioctilsulfosuccinato sódico), que aumenta la retención de los fármacos.

Posteriormente, se hacen pasar por dichos cartuchos: 4 ml orina; 4 ml metanol.

El metanol eluye del cartucho a la isoniazida y a la acetilisoniazida.

El eluido metanólico ya puede inyectarse en el cromatógrafo.

Los resultados obtenidos con la C.L.A.E. confirman los obtenidos con la técnica colorimétrica.

#### 3.4. Resultados

El número de muestras analizado ha sido de 65. Todas las muestras han sido proporcionadas por la Unidad de Pediatría del Hospital de Ntra. Sra. del Mar.

El porcentaje de acetiladores rápidos y lentos obtenido es el siguiente:

$$\% \text{ Acetiladores lentos} = \frac{54}{65} \times 100 = 83.08 \%$$

$$\% \text{ Acetiladores rápidos} = \frac{11}{65} \times 100 = 16.92 \%$$

En la figura 2 aparece el histograma de distribución de frecuencias.

#### 4. CONCLUSIONES

- 1: Cuando se pretende determinar el porcentaje de acetiladores rápidos y lentos que existen en una población, considerada globalmente, la prueba de la sulfadimidina es la más indicada para llevar a cabo el fenotipo de los individuos.
- 2: En los pacientes con tuberculosis, o bien, con una primoinfección tuberculosa, es preferible utilizar la isoniazida para determinar su fenotipo acetilador. Esta elección es debida a que la isoniazida será el

fármaco utilizado en la terapéutica y a que el objetivo de la determinación del fenotipo acetilador es optimizar el régimen de dosificación para cada paciente en particular, e intentar prevenir los efectos secundarios nocivos derivados del tratamiento con isoniazida, que están relacionados con el fenotipo del individuo.

- 3: La técnica analítica de elección, cuando se utiliza como fármaco, para realizar el fenotipo de los individuos, la isoniazida, es la colorimetría, debido a su sencillez, exactitud y rapidez.
- 4: La cromatografía líquida de alta eficacia es el método analítico de elección, cuando se pretende realizar una determinación cuantitativa, o bien, cuando con la técnica colorimétrica se obtiene un resultado que se encuentra en el límite de discriminación (70 %).
- 5: El número de muestras analizadas ha sido de 65. Las muestras han sido facilitadas por la Unidad de Pediatría del Hospital de Ntra. Sra. del Mar.

El porcentaje de acetiladores rápidos que se ha obtenido en este estudio, 16.92 %, concuerda con los datos que se tienen de otros países de la zona mediterránea.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Eichelbaum, M.: **TIPS**. 2: 31 (1981).
- 2) Eichelbaum, M. y cols.: **Clin. Pharmacol. Ther.** 31: 184 (1982).
- 3) Kalow, J. y cols.: **Clin. Pharmacol. Ther.** 21: 530 (1976).
- 4) Ellard, G.A.: **Clin. Pharmacol. Ther.** 19: 610 (1976).
- 5) Evans, D. y cols.: **Br. Med. J.** 13: 485 (1960)..
- 6) **The Pharmaceutical Codex**. 11.<sup>a</sup> Ed. The Pharmaceutical Press. London (1979).
- 7) Goodman and Gilman, **Las bases farmacológicas de la terapéutica**. 6.<sup>a</sup> Ed. Editorial médica panamericana, pp. 1176 (1981).
- 8) Pratt, W.B.: **Chemotherapy of infection**. 1.<sup>a</sup> Ed. Oxford University Pres. pp. 243 (1977).
- 9) Martindale, **The Extra Pharmacopoeia**. 27.<sup>a</sup> Ed. The Pharmaceutical Press. London, pp. 1478 (1979).
- 10) Mitchell, J.R. y cols.: **Clin. Pharmacol. Ther.** 18: 70 (1975).
- 11) Drayer, D.E.: **Clin. Pharmacol. Ther.** 22: 251 (1977).
- 12) Park, J., Vilter, R.W.: **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 85: 839 (1954).
- 13) Girling, D.J.: **Drugs**. 23: 56 (1982).
- 14) Devadatta, S., y cols.: **Bull. W.H.O.** 23: 587 (1960).
- 15) Schröder, H.: **Br. Med. J.** 3: 495 (1970).
- 16) Sunshine, I.: **Methodology for analytical toxicology**. 2.<sup>a</sup> Ed. Editorial CRC Press. Cleveland. pp. 202 (1975).
- 17) Fox, H.H., Gibas, J.T.: **J. Organic Chem.** 18 (2): 1375 (1953).

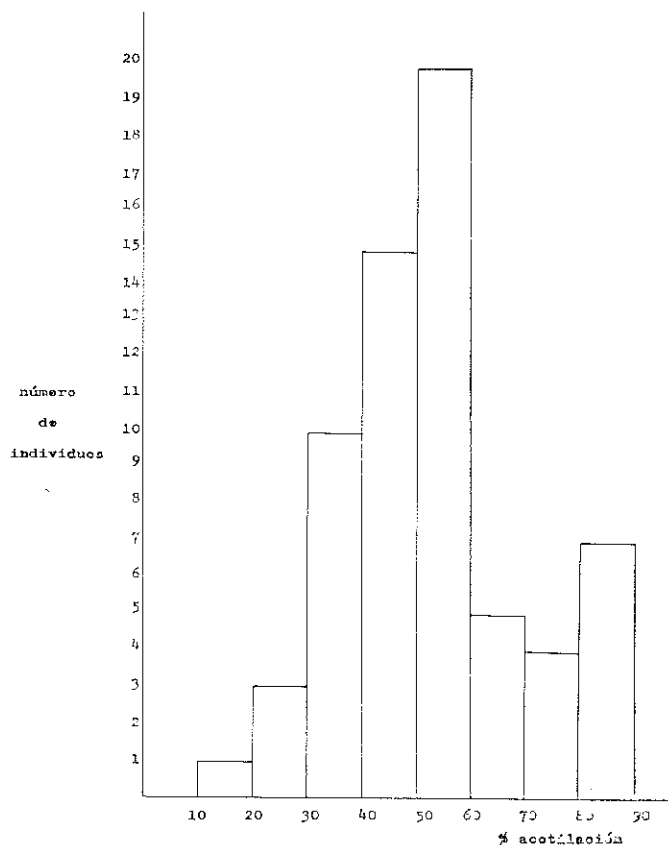


Figura 2

Histograma de distribución de frecuencias.