

detectables (Sloan i col.ls, 1978, Smith i col.ls, 1978). Un altre estudi realitzat amb guanetidina no demostra una disminució del seu metabolisme en els hidroxiladors pobres de l'esparteïna (Eichelbaum, 1982).

Fenacetina

Aquest analgèsic, que gairebé ja no s'empra en l'actualitat per causa de la seva toxicitat renal i hematològica, es transforma per mecanismes oxidatius en paracetamol. Els hidroxiladors pobres presenten una baixa formació de paracetamol a partir de la fenacetina (Sloan i col.ls, 1978). També s'ha demostrat que la incidència de metahemoglobinèmia és molt més alta entre els metabolitzadors lents de la debrisoquina (Kong i col.ls, 1982). Hi ha no obstant una via alternativa d'hidroxilació de la fenacetina que no està determinada pel mateix locus genètic. Els hidroxiladors pobres, que no poden metabolitzar aquest fàrmac per la via habitual, ho fan en una quantitat important per l'alternativa. Així, es produeix una quantitat important

de 2-hidroxifenetidina, que és un metabòlit bastant tòxic (Richie i col.ls, 1980). És possible que molts dels efectes adversos de la fenacetina estiguin relacionats amb una disminució de la capacitat per a metabolitzar-la.

Metiamida

Es tracta d'un antihistamínic H₂ que es va deixar de desenvolupar quan ja havia arribat a la fase III, per causa de l'elevada incidència d'agranulocitosi que el seu ús comportava. Aquest risc semblava estar influït pel polimorfisme hidroxilador (Idle i col.ls, 1979). És possible que les reaccions atribuïdes a aquest fàrmac siguin relacionades amb la dosi i en gran part degudes al caràcter metabolitzador de la debrisoquina i l'esparteïna, i que els hidroxiladors pobres presentin un risc superior de patir-les (Richie i col.ls, 1980).

Metoxiamfetamina

El metabolisme d'aquesta amfetamina té una variabilitat interindividual molt important. Els individus que metabolitzen poc aquest fàrmac són a la vegada hidroxiladors pobres de la debrisoquina (Kitchin i col.ls, 1979). Els autors d'aquest treball suggereixen que els metabolitzadors pobres són susceptibles de presentar-ne uns efectes més intensos i a més a més poden presentar ocasionalment algunes reaccions adverses greus. Kitchin i col.ls apunten la possibilitat que aquests individus, a més del defecte hidroxilador, tinguin una baixa capacitat de desactivar certes psicotoxines que poden fer l'individu més susceptible de patir alguns quadres psiquiàtrics. En qualsevol cas, calen més investigacions sobre els possibles polimorfismes que puguin afectar els nivells de dopamina-beta-hidroxilasa i de catecol-O-metiltransferasa, enzims que a més a més podrien tenir relació amb algunes alteracions mentals (Weinshilboum, 1983).

Fenformina

Aquest hipoglucemiant oral s'ha deixat d'emprar per causa de l'elevat risc d'acidosi làctica, amb conseqüències potencialment greus, que el seu ús comportava. Sembla que la fenformina és metabolitzada a hidroxifenformina pel mateix citocrom P-450 que la debrisoquina, i que hi ha una estreta correlació en la capacitat de metabolitzar els dos fàrmacs (Oates i col.ls, 1982). S'ha especulat amb la possibilitat que aquesta reacció greu a la fenformina només s'hauria produït en metabolitzadors pobres. Així, voluntaris que eren metabolitzadors pobres han presentat nivells bastant alts de lactat després de la presa del fàrmac (Idle i col.ls, 1981b, Oates i col.ls, 1983). Les dades epidemiològiques sueques indiquen que no queda del tot demostrat que l'acidosi sigui només una reacció dels hidroxiladors pobres (Wiholm, 1988).

Hi ha indicis de la possible implicació del metabolisme d'altres fàrmacs amb el fenotip de la debrisoquina, però que tenen una documentació molt insuficient que de moment no permet treure cap conclusió. L'estudi fenotípic i el

seguiment de les reaccions adverses poc usuals amb aspecte d'estar produïdes per nivells massa elevats d'un fàrmac (reaccions de tipus A) són els mitjans que poden donar dades més concloents respecte a la influència dels factors genètics que poden modificar la resposta farmacològica.

1.4.2.3.4. Càncer i oxidació de substàncies tòxiques ambientals

El metabolisme hidroxilador podria tenir alguna influència sobre la destoxificació o fins i tot sobre la formació de substàncies tòxiques. En un apartat anterior s'ha revisat la relació entre el fenotip acetilador de la isoniazida i el risc de reaccions d'hepatotoxicitat. El treball d'Idle i col.ls (1981a) és pioner en el camp de les reaccions d'hidroxilació. Aquests autors varen estudiar el fenotip de la debrisoquina en una població nigeriana de pacients afectes d'hepatoma primari i altres malalts amb tumors gastro-intestinals, comparant-los amb individus normals. En aquest estudi es va observar que els individus amb

quadres neoplàstics presentaven una tendència significativa a tenir una raó metabòlica superior, en comparació amb els normals. Malgrat això, és difícil treure conclusions d'aquest fet, ja que no s'ha d'oblidar que un augment de la raó metabòlica mesurada per nivells urinaris també pot ser degut a un augment de l'excreció renal sense més implicacions metabòliques.

1.4.2.3.5. Malaltia de Parkinson i oxidació de substàncies ambientals i fàrmacs

L'any 1817 Parkinson va descriure la fenomenologia clínica d'una síndrome, que porta el seu nom (malaltia de Parkinson) i que es caracteritza principalment per tremolor essencial, rigidesa, hipocinèsia, alteració de reflexos posturals i, en molts casos, depressió o altres anomalies del comportament. La fisiopatologia d'aquesta malaltia també es coneix des de fa bastant de temps. La malaltia de Parkinson reflexa un dèficit dopaminèrgic de les cèl.lules de la substància negra i del cos estriat cerebrals (Marsden i col.ls, 1982). Per a

explicar l'etiopatogènia de la malaltia de Parkinson s'han proposat diverses teories que intenten identificar les causes que provoquen l'alteració de la transmissió dopaminèrgica característica d'aquesta entitat. S'han proposat factors genètics, la degeneració neuronal pròpia de l'edat avançada (Calne i col.ls, 1983; Mc Geer i col.ls, 1977) i l'exposició a fàrmacs i substàncies amb potencialitat neurotòxica (Stephen i col.ls, 1984; Langston, 1987). Estudis realitzats en bessons (Ward i col.ls, 1983) han demostrat una baixa concordança entre aquesta patologia i els factors genètics. Sembla més probable que certs factors ambientals (infeccions, medicaments i altres substàncies) puguin posar de manifest un estat latent de dèficit dopaminèrgic propiciat per l'edat de l'individu, que produeix un envelliment neuronal lent i constant (Calne i col.ls, 1983; 1986). Les manifestacions clíniques apareixen quan s'ha perdut aproximadament un 80% de la capacitat dopaminèrgica cerebral, produint-se així un domini colinèrgic amb desequilibri entre el sistema de la dopamina i el de l'acetilcolina. Malgrat que el parkinsonisme és més freqüent en pacients d'edat avançada, cosa que sembla estar en consonància amb la teoria exposada anteriorment, no es

pot oblidar que també pot aparèixer en l'edat mitjana de la vida.

En els darrers anys s'ha prestat especial atenció a alguns fàrmacs (neurolèptics) i productes químics (pesticides, herbicides) com a possibles causants de síndrome de Parkinson (Stephen i col.ls, 1984; Bamrah i col.ls, 1987; Langston, 1987; Chapman i col.ls, 1987), és a dir a la presentació de tremolor, hipocinèsia i rigidesa sense degeneració neuronal. La majoria dels xenobiòtics són metabolitzats a l'organisme per tal de facilitar-ne la seva eliminació. Els individus amb una capacitat metabòlica disminuïda podrien ser més susceptibles a patir reaccions de neurotoxicitat per acumulació de certes substàncies i fàrmacs.

Un estudi realitzat per Barbeau i col.ls (1985), en el qual es va determinar el fenotip hidroxilador de la debrisoquina en 40 individus sans i 40 en pacients parkinsonians, va objectivar diferències de distribució de les raons metabòliques entre les dues poblacions. Els malalts parkinsonians presentaven una clara tendència a metabolit-

zar la debrisoquina de manera més lenta que la població de control, sobretot a expenses d'un alt percentatge de metabolitzadors intermedis.

No obstant, posteriorment els propis investigadors varen observar que aquestes diferències eren degudes al consum més elevat de fàrmacs antihistamínics en el grup de malalts parkinsonians, i que aquests fàrmacs havien interferit en la determinació del fenotip (Poirier i col.ls, 1987). En un altre estudi realitzat per Steventon i col.ls (1988), en el qual es va valorar la capacitat metabòlica microsomal (hidroxilació de la debrisoquina, sulfoxidació de la carbocisteïna, conjugació del paracetamol) en malalts parkinsonians i en els seus respectius controls, no es varen trobar diferències en el metabolisme de la debrisoquina; en canvi, sí que hi va haver diferències significatives en el de la carbocisteïna i el del paracetamol, que eren metabolitzats de manera més lenta pels pacients parkinsonians.

S'han descrit interaccions entre la determinació del fenotip hidroxilador de la debrisoquina i l'ús de fàrmacs que



poden ser emprats amb freqüència pels malalts parkinsonians abans del diagnòstic i durant el curs de la seva malaltia. Els neurolèptics poden afavorir el desenvolupament de parkinsonisme i, tanmateix, tenen efectes inhibitoris sobre el metabolisme de la debrisoquina (Syvälahti i col.ls, 1986). El mateix fenomen es pot observar amb els fàrmacs antihistamínics, els quals, a més de ser sospitosos de produir alteracions extrapiramidals, poden interferir en la determinació del fenotip hidroxilador (Poirier i col.ls, 1987). També hi ha indicis que la levodopa inhibeix el sistema metabòlic microsomal quan s'administra junt amb inhibidors de la dopa-descarboxilasa (Vesell i col.ls, 1971).

1.4.2.3.6. Variabilitat genètica de l'oxidació de fàrmacs no relacionada amb el metabolisme de la debrisoquina i l'esparteïna

Apart de les possibles variacions descrites en els apartats anteriors, hi ha variacions del metabolisme de causa

genètica en les quals els enzims responsables de la biotransformació són uns citocroms P-450 diferents dels que actuen sobre la debrisoquina i l'esparteïna. Això sembla evident pel que fa al metabolisme de la fenitoïna i de la mefenitoïna. El mateix es podria dir sobre l'antipirina, que sembla ser metabolitzada de manera compartida per tres vies diferents, la 3 i la 4-hidroxilació i la desmetilació (Danhof i col.ls, 1979); cadascuna d'aquestes vies sembla estar en relació amb un citocrom microsomal diferent (Inaba i col.ls, 1980).

Estudis realitzats en grups de població sana han donat distribucions trimodals de la velocitat del metabolisme de l'antipirina (Kellerman i col.ls, 1976). Sembla ser, a més a més, que els tres isoenzims hepàtics responsables d'aquesta biotransformació estan determinats per tres gens independents (Vesell i Penno, 1983). També s'ha de tenir en compte que el metabolisme de l'antipirina està subjecte a variacions degudes a factors ambientals (Vesell i Penno, 1983; Blain i col.ls, 1982; Penno i col.ls, 1981; Penno i Vesell, 1983).

És evident que existeix una certa relació entre el metabolisme de l'antipirina i el de la debrisoquina, perquè comparteixen la 4-hidroxilació, però cal tenir en compte que la biotransformació de l'antipirina depèn a més a més d'altres vies metabòliques (Bertilsson i col.ls, 1980; Danhof i col.ls, 1981).

Altres fàrmacs que no són biotransformats per la mateixa via hidroxilativa que la de la debrisoquina/esparteïna però la metabolització dels quals ha presentat polimorfisme són l'amobarbital (Kalow i col.ls, 1982; Riley i col.ls, 1978), la tolbutamida (Scott i Poffenberger, 1979; Idle i col.ls, 1979) i la carboximetilcisteïna (Warning i col.ls, 1982; Mitchell i col.ls, 1984; Panayi i col.ls, 1983).

1.4.2.3.7. El polimorfisme de metabolisme i el desenvolupament de nous fàrmacs

Quan es realitzen estudis farmacocinètics de nous fàrmacs,

per a establir la dosi òptima i altres paràmetres que afecten el maneig clínic del fàrmac, pot ser molt útil conèixer si aquests són metabolitzats per vies de les quals se sap que estan sotmeses a polimorfisme genètic (Eichelbaum, 1982; Idle, 1983). Així, també la fase d'establiment de l'eficàcia mitjançant assaigs clínics es pot veure beneficiada si es té en compte la possible variabilitat interindividual de causa genètica que pot fer els grups d'estudi més comparables pel que fa als requeriments de dosi. També pot ser útil establir les possibles diferències racials degudes a la variabilitat metabòlica, que pot fer que una determinada comunitat no necessiti les mateixes dosis d'un nou fàrmac en comparació amb les condicions òptimes de tractament que s'hagin establert en una població diferent. Finalment, la inclusió dels estudis de farmacogenètica en la investigació de les reaccions adverses pot ajudar en molts casos a entendre millor la naturalesa i el possible mecanisme de l'efecte indesitjable examinat. S'ha de tenir en compte que moltes reaccions adverses de causa genètica es podrien evitar mitjançant l'administració de dosis més baixes, o bé buscant alternatives terapèutiques o administrant tractaments combinats.

2. OBJECTIUS

Els estudis de farmacogenètica fets al nostre medi són molt escassos. S'han publicat dades sobre algunes sèries que han donat resultats de vegades discordants (March, 1966; Saucedo i col.ls, 1985; Ladero i col.ls, 1979; Redondo i col.ls, 1980; Ahumada i col.ls, 1983; Martínez Jordà, 1980). Aquestes diferències podrien ser degudes a diverses raons: (1) els estudis fets fins ara no han inclòs un nombre suficientment ampli d'individus, (2) els criteris de selecció no sempre han estat els mateixos, o bé (3) la tècnica analítica no sempre ha estat la mateixa. En realitat les proporcions d'acetiladors ràpids van des d'un 15% a un 43%, fet que probablement es deu a les diferències metodològiques esmentades.

La informació referent al fenotip hidroxilador encara és més limitada (Benítez, 1988).

Per altra banda, apart de les dificultats d'interpretació dels pocs treballs descriptius realitzats fins ara, el fenotip metabolitzador ha estat poc estudiat en relació amb determinades patologies possiblement iatrogèniques.

Per aquests motius, hem seleccionat els següents objectius del present treball:

- a) Establir els percentatges dels fenotips acetilador ràpid i acetilador lent del metabolisme de la isoniazida en una població seleccionada en funció de característiques que no tenen relació aparent amb el consum de medicaments ni amb patologies que tinguin una associació -positiva o negativa- amb els diferents polimorfismes genètics.
- b) De manera anàloga, establir els percentatges dels fenotips hidroxilador extens i hidroxilador pobre de la debrisoquina.
- c) Estudiar la influència de factors com l'edat, el sexe, el lloc de procedència i el consum de tabac, cafè i alcohol sobre els resultats de la determinació del fenotip acetilador de la isoniazida i del fenotip hidroxilador de la debrisoquina.
- d) En particular, estudiar la possible associació entre el

risc de parkinsonisme i el fenotip hidroxilador de la debrisoquina.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. CONSIDERACIONS GENERALS

L'estudi de poblacions de voluntaris sans és una de les maneres de conèixer la prevalença i la distribució dels diferents fenotips que pot manifestar un determinat caràcter genètic. La manera més habitual de determinar els fenotip d'un polimorfisme de metabolisme d'un fàrmac és estudiar la relació de les concentracions urinàries o plasmàtiques d'aquest fàrmac i les del seu metabòlit o metabòlits principals. Aquesta relació dona una idea indirecta de la depuració intrínseca de la via metabòlica estudiada. Aquest paràmetre, anomenat raó metabòlica, està menys subjecte a variacions que altres paràmetres, com per exemple l'àrea sota la corba (AUC), i és més senzill de mesurar que la depuració intrínseca.

Habitualment un sol gen controla la manifestació d'un polimorfisme. No obstant, l'expressió d'aquest gen s'ha d'entendre en relació amb un entorn de factors ambientals i en relació amb altres gens que poden afectar el resultat final (vegeu la figura 1). Dins del que s'entén

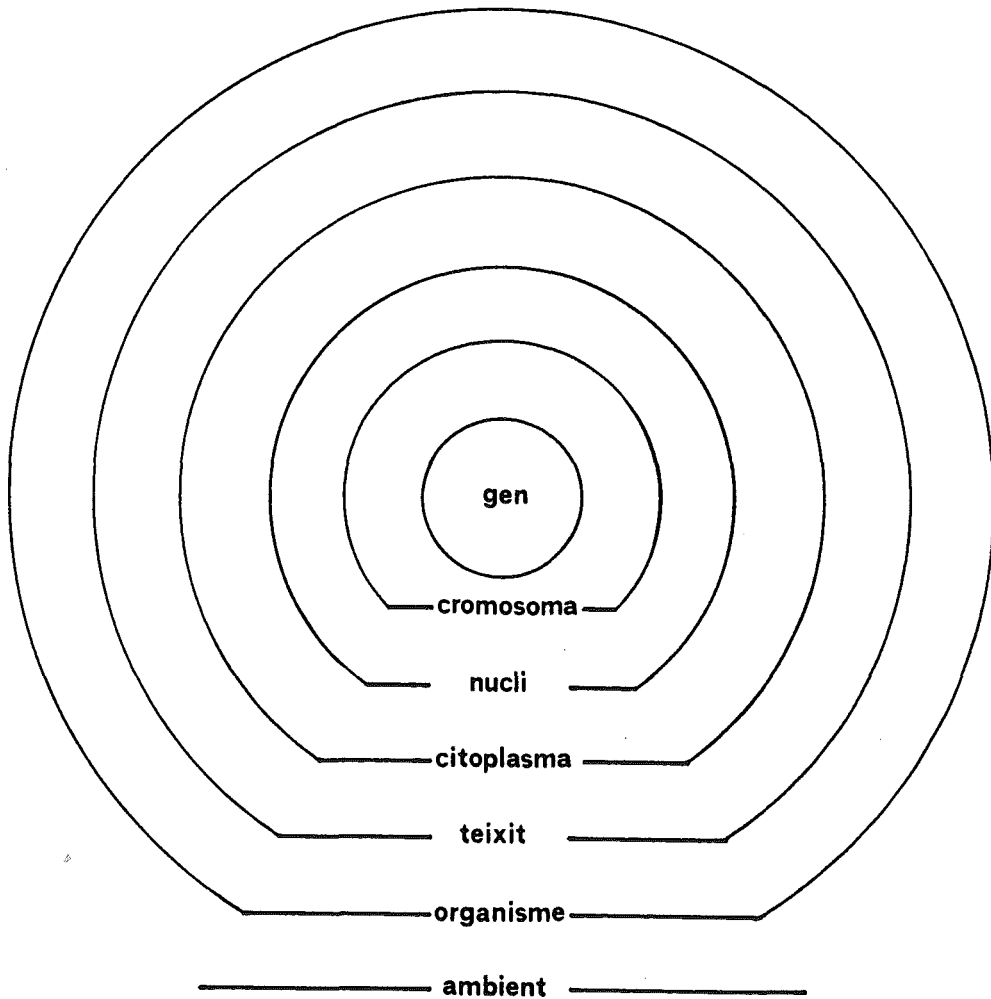


Figura 1. - Cal entendre l'expressió d'un gen en relació a un entorn de factors ambientals i d'altres gens. (Segons Weiss, a Strickberger MW. Genética. Omega. Barcelona, 1974).

com a "ambient", es poden considerar l'edat, el sexe, el pes i altres determinants que s'han de diferenciar de la resta de factors ambientals als quals tantes referències s'han fet en les publicacions sobre farmacogenètica. És important fer aquesta diferenciació, ja que els que més poden emmascarar l'expressió d'un gen no són precisament els factors esmentats en primer lloc -que es poden controlar amb certa facilitat-, sinó tota una sèrie de factors físics i químics que conformen l'entorn de l'individu entès com a un ésser biològic.

Si s'imagina la transmissió d'un polimorfisme amb un model senzill de tipus monogènic amb dos al·lels per a un mateix locus, es poden fer les següents consideracions quan es diu que la transmissió és autosòmica recessiva.

En la població sotmesa a aquest polimorfisme es poden trobar tres fenotips que representarien els tres genotips possibles per a aquell caràcter genètic. Aquests tres genotips resulten de la combinació dels dos al·lels, un dominant (R) i l'altre recessiu (r). La combinació RR -homozigot de l'al·lel dominant- dona lloc a un fenotip

corresponent al caràcter dominant, igual que la combinació Rr -heterozigot-. Només la combinació rr -homozigot de l'al·lel recessiu- dona lloc al genotip del caràcter recessiu.

Això és el que succeeix amb els polimorfismes de la isoniazida i de la debrisoquina. Quan es mesura la capacitat de metabolització d'aquests fàrmacs en una població determinada, s'obté una distribució bimodal. No obstant, la població està constituïda per tres fenotips, entre els quals els individus heterozigots (Rr) manifesten el caràcter dominant. Amb tècniques que tinguin una precisió suficient es poden indentificar els individus heterozigots, que es situen en una posició intermèdia, més a prop de la població d'homozigots acetiladors o hidroxiladors ràpids. Malgrat això, no s'han identificat diferències amb trascendència clínica entre els homozigots (RR) i els heterozigots (Rr) de metabolisme ràpid i/o normal (complet).

3.2. DETERMINACIÓ DEL FENOTIP ACETILADOR DE LA ISONIAZIDA

3.2.1. POBLACIÓ ESTUDIADA

S'ha determinat el caràcter acetilador en una mostra de 126 individus (65 homes i 61 dones). La majoria d'ells eren estudiants de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i pacients sotmesos a profilaxi antituberculosa que iniciaven el tractament (primera dosi: 5-10 mg/kg al dia, 300 mg com a màxim). La mitjana d'edat dels mateixos era de 19,6 + 6,9 anys (de 3 a 46 anys). Es va recollir informació sobre la ingesta d'alcohol, cafè i sobre l'hàbit de fumar, a més d'antecedents patològics i farmacològics en els dos mesos anteriors a la determinació del fenotip. Es varen excloure els individus que ja estaven prenent isoniazida, per causa de la possible autoinducció que pot exercir el fàrmac sobre el seu propi metabolisme. A més a més, es varen descartar els candidats i pacients amb altres factors que poguessin modificar el metabolisme de la isoniazida (ingesta de fàrmacs, patologia renal i alteracions hepàtiques).

La presa de 300 mg d'isoniazida es va realitzar després de buidar la bufeta urinària. A les 4 hores de la ingesta es va recollir una alíquota d'orina que va ser emmagatzemada a -20°C .

3.2.2. TÈCNICA ANALÍTICA

Mitjançant una tècnica de cromatografia líquida (Perkin-Elmer series-2) es va determinar, per duplicat, la proporció d'isoniazida (INH) i d'acetilisoniazida (AcINH) continguda en l'orina (Price Evans i col.ls, 1960). La tècnica cromatogràfica utilitzada ve ser la següent (Eidus i col.ls, 1971):

a) Extracció:

1. Es prenen 0,5 ml de solució patró (INH 6 mM + AcINH 5,7 mM en H_2O).

2. S'hi afegeixen 4 ml de ClH 0,1 M.
3. S'hi afegeixen 50 μ l d'anhídrid propiònic.
4. Es deixa reposar la barreja durant uns 10 minuts.
5. Es realitza l'extracció mitjançant un filtre Sep-Pak (Millipore-Waters) C18, o de característiques similars, i es recull l'últim ml. Se n'injecten 40 μ l.

b) Condicions cromatogràfiques:

1. Fase mòbil: 26% d'acetonitril + 74% de tampó.
Tampó: Dodecil sulfat 2 mM + tampó fosfat 10 mM, de
pH = 2,6.
2. Columna: Supelco C18 15 cm/5 μ .
3. Flux: 2 ml/min.
4. Temperatura: 30°C.

5. Detecció: espectrofotomètrica, amb una longitud d'ona de 270 nm.

c) Càlcul de la raó de metabolisme acetilador (RM):

Amb les dades obtingudes s'aplica la següent equació:

$$\frac{\text{AUC AcINH mostra}}{\text{AUC INH mostra}} \times \frac{\text{AUC INH estàndard}}{\text{AUC AcINH estàndard}} \times 0,95 = \frac{\text{AcINH}}{\text{INH}} = \text{RM}$$

3.2.3. ASSIGNACIÓ DELS FENOTIPS

Es varen considerar acetiladors ràpids (fenotips AA i Aa) els individus que presentaven una raó metabòlica superior a 1,43 i lents (fenotip aa) els que no superaven aquest valor. Els individus amb una raó metabòlica compresa entre 1,03 i 1,43 serien heterozigots (Aa). No obstant, segons les dades disponibles obtingudes en els nombrosos estudis que s'han realitzat fins ara sobre el polimorfisme de

l'acetilació, aquest grup no presenta diferències rellevants respecte a l'homozigot AA.

3.2.4. CARACTERÍSTIQUES FARMACOCINÈTIQUES RELLEVANTS DE LA ISONIAZIDA

a) Absorció.- Es pot trobar un pic màxim de concentració 1-2 hores després de la seva administració oral (Robson i Sullivan, 1963). Té una biodisponibilitat del 90% (Weber i Hein, 1979). Els acetiladors ràpids poden tenir una concentració inicial més baixa, per causa d'un possible efecte de primer pas.

b) Distribució.- La unió a les proteïnes plasmàtiques és quasi nul·la (Boxenbaum i col.ls, 1975). El volum de distribució és de 0,6 l/kg (Jenne i col.ls, 1961; Ellard i col.ls, 1973, Boxenbaum i Riegelman, 1976).

c) Metabolisme.- Els principals metabòlits són l'acetilisoniazida (30-40%), la diacetilhidrazina (5-25%) i

l'acetilhidrazina (2-3%) (Timbrell i col.ls, 1977). A més dels esmentats, hi ha altres productes de metabolització (Boxenbaum i Riegelman, 1976; Ellard i Gammon, 1976). S'ha de tenir en compte que les proporcions en què es formen aquestes substàncies depenen del fenotip acetilador.

d) Excreció.- És majoritàriament renal i no sembla estar massa influïda pel fenotip acetilador (Weber i Hein, 1979). La isoniazida s'excreta en forma inalterada en un 10% en els acetiladors ràpids i en un 30% en els lents (Barclay i col.ls, 1953; Timbrell i col.ls, 1977).

3.3. DETERMINACIÓ DEL FENOTIP HIDROXILADOR DE LA DEBRISOQUINA

3.3.1. POBLACIÓ ESTUDIADA

Es varen incloure 156 estudiants de Medicina de la Uni-

versitat Autònoma de Barcelona i altres procedents d'una mostra aleatòria del cens de població de la ciutat (76 homes, 79 dones i 1 desconegut). L'edat mitjana dels voluntaris era de $24,6 + 5,5$ (de 18 a 56). Com en la determinació del fenotip acetilador, es varen recollir dades com l'edat, sexe, ingesta d'alcohol, cafè i hàbit de fumar. També es varen recollir els antecedents farmacològics i patològics dels dos darrers mesos. Es varen excloure, com en l'estudi anterior, els individus que estaven prenent algun fàrmac o que patien alteracions renals o hepàtiques.

Es va administrar una dosi única de 10 mg de debrisoquina (Declinax® Roche). Aquesta dosi és tan sols una quarta part de la mínima necessària per produir un efecte antihipertensiu eficaç. Malgrat això, i per tal d'evitar la remota possibilitat d'una hipotensió postural transitòria, el fàrmac es va administrar abans d'anar a dormir, previ buidament de la bufeta urinària. L'orina es va recollir a les 8 hores de la presa i es va refrigerar a -20°C .

3.3.2. TÈCNICA ANALÍTICA

Les mostres es varen processar, per duplicat, mitjançant cromatografia de gasos (Perkin-Elmer, Sigma 3B) segons la tècnica d'Ellard i col.ls (1977) per determinar la proporció de debrisoquina (D) i 4-hidroxidebrisoquina (OH-D) (Mahgoub i col.ls, 1977). El procés analític és el següent:

a) Extracció:

1. Es pren 1 ml de mostra.
2. S'hi afegeixen 0,5 ml de solució saturada de CO_3HNa .
3. S'hi afegeixen 0,5 ml de metanol.
4. S'hi afegeixen 5 μg de guanoxà com a patró intern.
5. S'hi afegeixen 0,5 ml d'acetilacetona.

6. S'incuba durant 16 h al bany maria a 50°C.
7. S'hi afegeixen 5 ml de dietil éter.
8. S'agita amb vòrtex durant 15 seg i es centrifuga durant 5 min.
9. Es descarta la fase aquosa.
10. S'afegeixen 250 μ l de ClH 4M.
11. Es descarta l'éter.
12. S'afegeixen 350 μ l de NaOH 4M + 200 μ l de ciclohexà.
13. S'agita amb vòrtex durant 15 seg i es centrifuga durant 5 min.
14. Es recull el ciclohexà (sobrenadant).
15. S'asseca i es redilueix amb 10-20 μ l de ciclohexà.

16. S'injecten 3 μ l.

17. Amb les mateixes condicions es construeix una escala que conté concentracions de D i OH-D d'1, 5, 15 i 30 mg/ml, per triplicat.

b) Condicions cromatogràfiques:

1. Gas portador: nitrogen, a un flux de 19 ml/min.

2. Columna: 1,8 metres x 1/4 amb fase ov.225. Partícula Gas-Chrom Q 100/120.

3. Temperatures: Columna a 230°C, detector a 270°C, injector a 270°C.

4. Detector: nitrogen-fósfor.

c) Càlcul de la raó de metabolisme hidroxilador (RM):

$$\frac{\% \text{ de la dosi D a orina}}{\% \text{ de la dosi OH-D en orina}} \times \frac{1}{0,92} = \frac{D}{\text{OH-D}} = \text{RM}$$

3.3.3. ASSIGNACIÓ DELS FENOTIPS

Es varen classificar com a hidroxiladors pobres o parcials els individus que tenien una raó metabòlica (D/OH-D) superior a 12,6. Per sota d'aquest valor els voluntaris es poden considerar hidroxiladors normals o complets; no obstant, igual que en el cas de la isoniazida, també es poden definir els individus que tenen una capacitat hidroxiladora intermèdia, que respondrien a un fenotip heterozigot.

3.3.4. FARMACOCINÈTICA

- a) Absorció.- La debrisoquina administrada per via oral s'absorbeix ràpidament i quasi en la seva totalitat.
- b) Distribució.- Pot ser que el més destacable en aquest apartat sigui el fet que aquest fàrmac es pot acumular en les plaquetes (Silas i col.ls, 1978).
- c) Metabolisme.- Es realitza per hidroxilació. Està sotmès a polimorfisme. El principal metabòlit és la 4-hidroxi-debrisoquina, que constitueix aproximadament un 70-80% de tots els metabòlits (Idle i col.ls, 1979). També s'ha de tenir en compte el caràcter saturable d'aquesta via (Silas i col.ls, 1978).
- d) Excreció.- És fonamentalment renal. La recuperació en orina és aproximadament d'un 70% entre debrisoquina inalterada i metabòlits (Allen i col.ls, 1975).

3.4. DETERMINACIÓ DEL FENOTIP HIDROXILADOR DE LA DEBRISOQUINA I LA FENITOÏNA EN MALALTS PARKINSONIANS

L'objectiu d'aquest apartat va ser estudiar la possible associació de la malaltia de Parkinson amb el fenotip hidroxilador de la debrisoquina (Barbeau i col.ls, 1985).

3.4.1. POBLACIÓ ESTUDIADA

Aquest estudi es va realitzar amb la col.laboració de tres serveis de Neurologia de grans hospital de Barcelona. S'hi varen incloure 19 homes i 35 dones amb diagnòstic recent de síndrome de Parkinson. Aquest diagnòstic era independent de la sospita etiològica (iatrogènica o tòxica) del quadre. El diagnòstic de parkinsonisme es basava en la presència d'un mínim de dos dels següents tres símptomes cardinals: tremolor, rigidesa i acinèsia.

La mitjana d'edat va ser de 65 anys i el marge era de 43 a 82 anys. A més de les dades bàsiques d'edat, sexe, i his-

tòria de la malaltia, es va realitzar una anamnesi farmacològica detallada per tal d'identificar medicaments que poguessin influir sobre la via metabòlica en estudi. L'estudi de la via hidroxiladora es va realitzar mitjançant la determinació de la raó metabòlica de la debrisoquina en orina i la determinació de la raó metabòlica de la fenitoïna en plasma.

3.4.2. TÈCNIQUES ANALÍTIQUES

3.4.2.1. Debrisoquina

Vegeu l'apartat 2.4.2.

3.5. MÈTODES ESTADÍSTICS

Les distribucions obtingudes de la determinació del feno-

tip acetilador de la isoniazida en voluntaris sans i del fenotip hidroxilador de la debrisoquina en voluntaris sans i en malalts parkinsonians, han estat descrites mitjançant paràmetres de centralització (mitjana, mediana, moda, antimoda), de dispersió (desviació típica o estàndard, marge -màxim i mínim-, biaix), i de localització (quartils), tant per a les distribucions dels conjunts de poblacions estudiades com per a les seves respectives subpoblacions. Quan aquestes variables es presenten en forma de categories, es descriu el percentatge de cadascuna d'elles. En el cas de les subpoblacions d'hidroxiladors lents es descriuen tots els casos degut al baix nombre d'individus que pertanyen a la mateixa (7 voluntaris sans, 2 malalts parkinsonians). Per tal de valorar l'aproximació a una distribució normal de les distribucions de variables contínues com l'edat i el logaritme de la raó metabòlica de les diferents mostres de població, s'ha aplicat el test de normalitat de Kolmogorov-Smirnoff, i s'ha representat gràficament amb el càlcul de pròbits acumulats.

La distribució calculada amb pròbits dóna la imatge visual de si un conjunt de dades presenta una distribució normal

(que correspon a una recta) o no. Per representar-ho es calculen les probabilitats acumulades en funció de la desviació típica o estàndard (D.E.). Per exemple, la probabilitat del 50% correspon a una desviació típica de zero, i el pròbit serà zero. En molts casos a cada valor de pròbit s'hi sumen 5 unitats per evitar l'aparició de valors negatius.

Per tal d'avaluar les possibles associacions entre les variables (edat, sexe, consum de tabac, cafè, i alcohol, i logaritme de la raó metabòlica) agrupades de manera categòrica, s'ha realitzat el test exacte de Fisher i a més, per a les variables contínues, s'ha aplicat una prova de correlació de Pearson.

Aquestes mateixes proves estadístiques s'han emprat per a valorar una possible associació entre el fenotip hidroxilador dels individus parkinsonians i el consum d'antipsicòtics, antidepressius, antihistamínics i levodopa més inhibidors de la dopa descarboxilasa en aquesta mostra de població.

Finalment, per tal de comparar les dues poblacions estudiades amb la debrisoquina (voluntaris sans i malalts parkinsonians), s'ha aplicat un test exacte de Fisher i la comparació de mitjanes mitjançant la prova de la U de Mann Whitney entre les diferents variables de les esmentades mostres de població.

4. RESULTATS

4.1. MOSTRA DE POBLACIÓ. ACETILADORS DE LA ISONIAZIDA
(INH)

La mostra de població estudiada es compon de 126 individus, amb una mitjana d'edat de $19,6 \pm 6,9$ anys ($x \pm D.E.$), un màxim de 46 anys i un mínim de 3. El 75% té una edat igual o inferior a 23,5 anys. Un 51,6% (65) són homes i un 48,4% (61) dones (vegeu la taula 2 i la figura 2). Un 30,8% dels individus són fumadors. El consum mitjà de tabac és de $14,4 \pm 8,2$ cigarrets al dia, amb un màxim de 40 i un mínim d'1 (vegeu la taula 3). Existeix una associació entre l'edat i els hàbits tòxics (tabac, cafè, i alcohol) (vegeu la taula 4), amb una important correlació positiva per a cadascun d'aquests hàbits ($p < 0,001$ en tots) (vegeu les figures 3, 4, 5 i 6). De la mostra analitzada, un 37,5% consumeix cafè, consum que arriba a un màxim de 6 tasses al dia, essent 2 tasses al dia el valor més freqüent. El consum mitjà és de $2,3 \pm 1,4$ tasses al dia (vegeu la taula 5). Pel que fa al consum d'alcohol, un 20% de la mostra en consumeix en quantitats que oscil·len entre els 8 i els 500 g per setmana, amb una mitjana de $135 \pm 13,9$ g per setmana (vegeu la taula 6).

Taula 2.- Distribució d'edats de la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

mitjana \pm D.E.	19,6 \pm 6,9		
mediana	20		
moda	23		
mínim = 3; màxim = 46			
biaix	0,42		
<hr/>			
	< 20 anys	> 20 anys	
	<hr/>		
	49,6%	50,4%	
<hr/>			
Quartils	25%	50%	75%
	<hr/>		
	14	20	23,5
<hr/>			

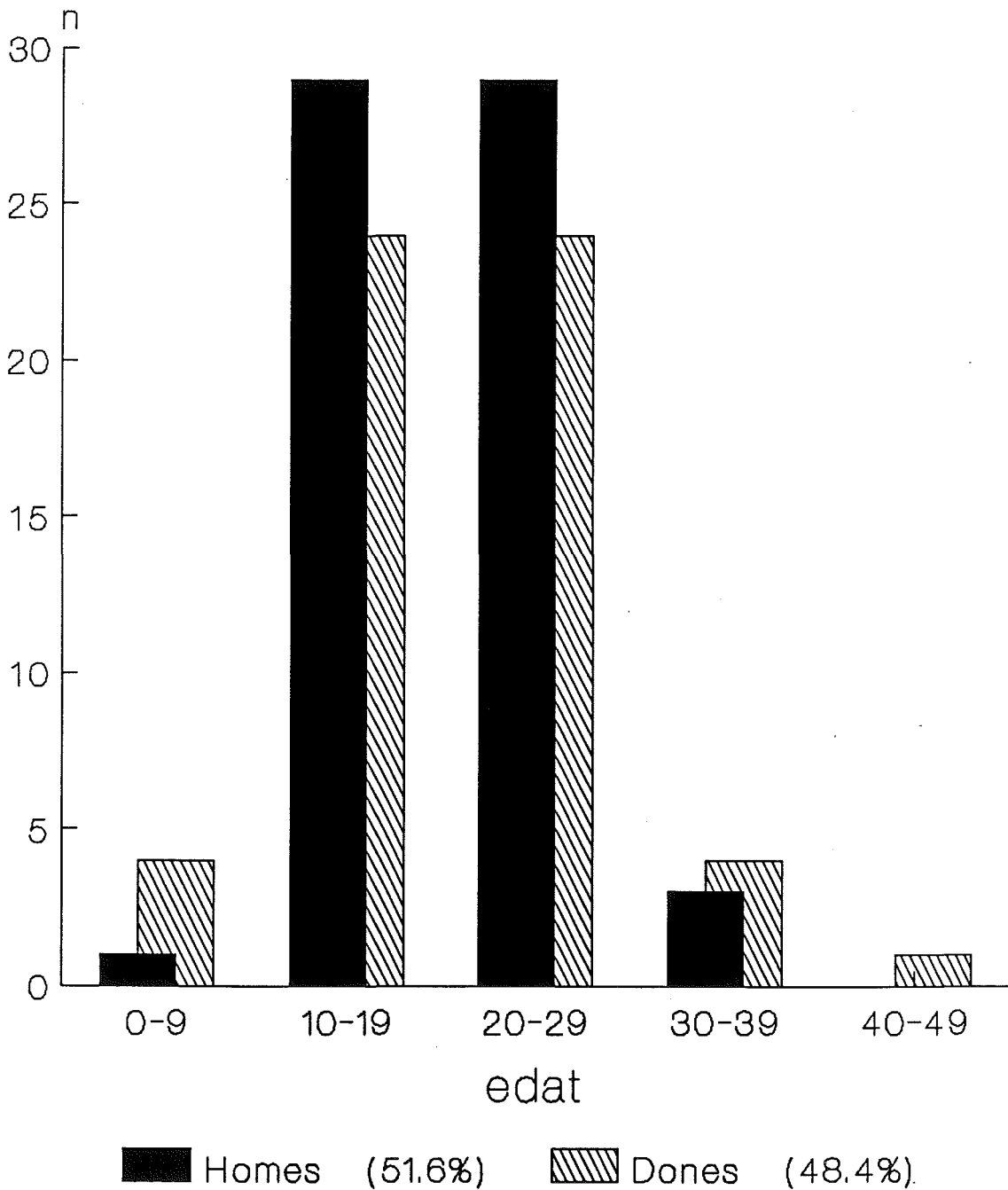


Figura 2.- Distribució per subgrups d'edat i sexe de la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

Taula 3.- Consum de tabac (nombre de cigarrets al dia) en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

mitjana \pm D.E.	14,4 \pm 8,2		
mediana	15		
moda	20		
mínim = 1; màxim = 40			
biaix	0,64		
	no fumadors	fumadors	
	69,2%	30,8%	
Quartils	25%	50%	75%
	10	15	20

Taula 4.- Encreuament de variables demogràfiques i fenotip acetilador en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida (valor de p).

	edat	sexe	tabac	café	alcohol	fenotip
edat	-	0,5;ns	$2,8 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-4}$	0,6;ns
sexe		-	0,3;ns	0,15;ns	0,23;ns	0,15;ns
tabac			-	$1,1 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-6}$	0,02
café				-	$1,2 \times 10^{-5}$	0,06;ns
alcohol					-	0,18;ns
fenotip						-

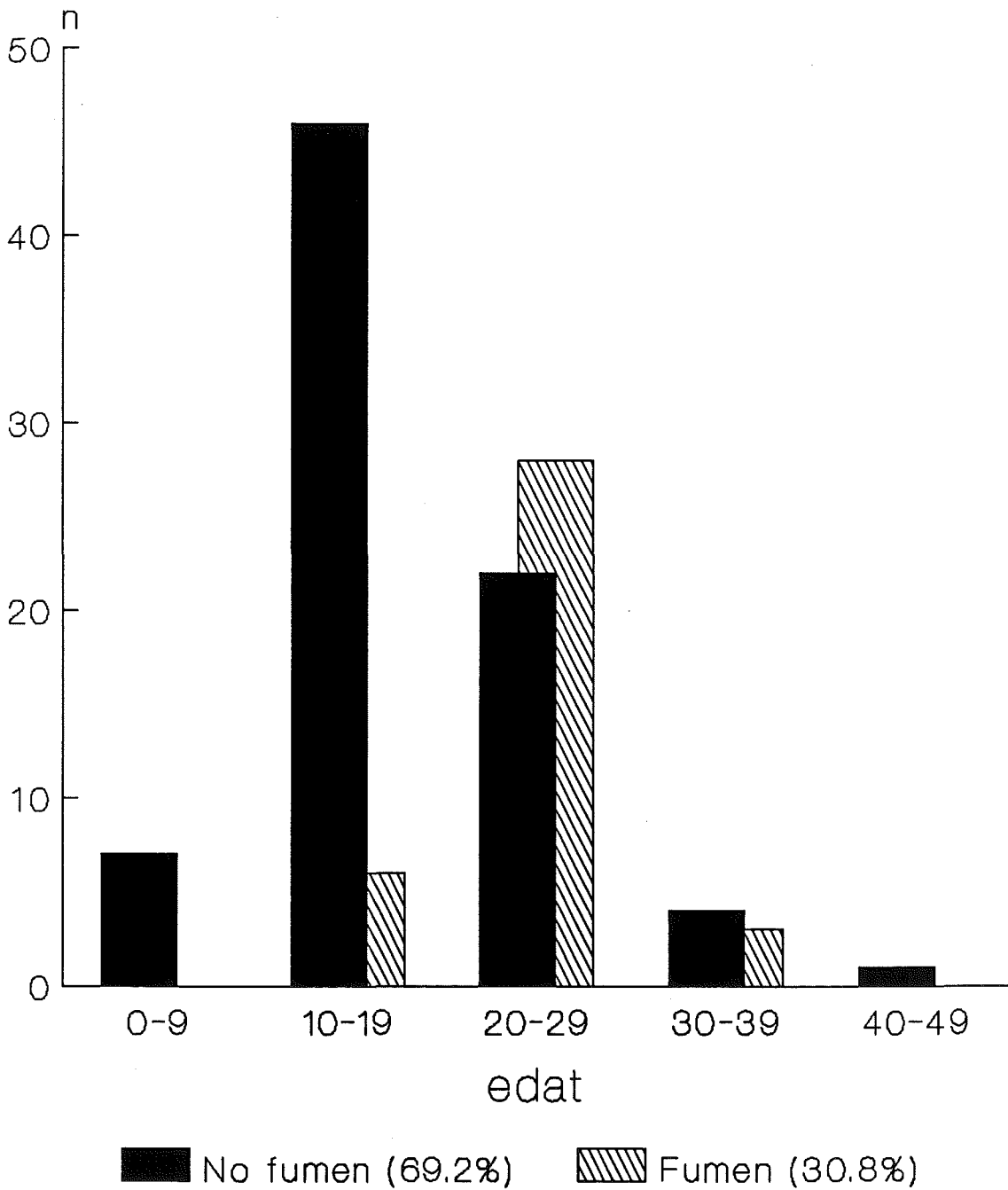


Figura 3.- Relació entre l'hàbit tabàquic i l'edat en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

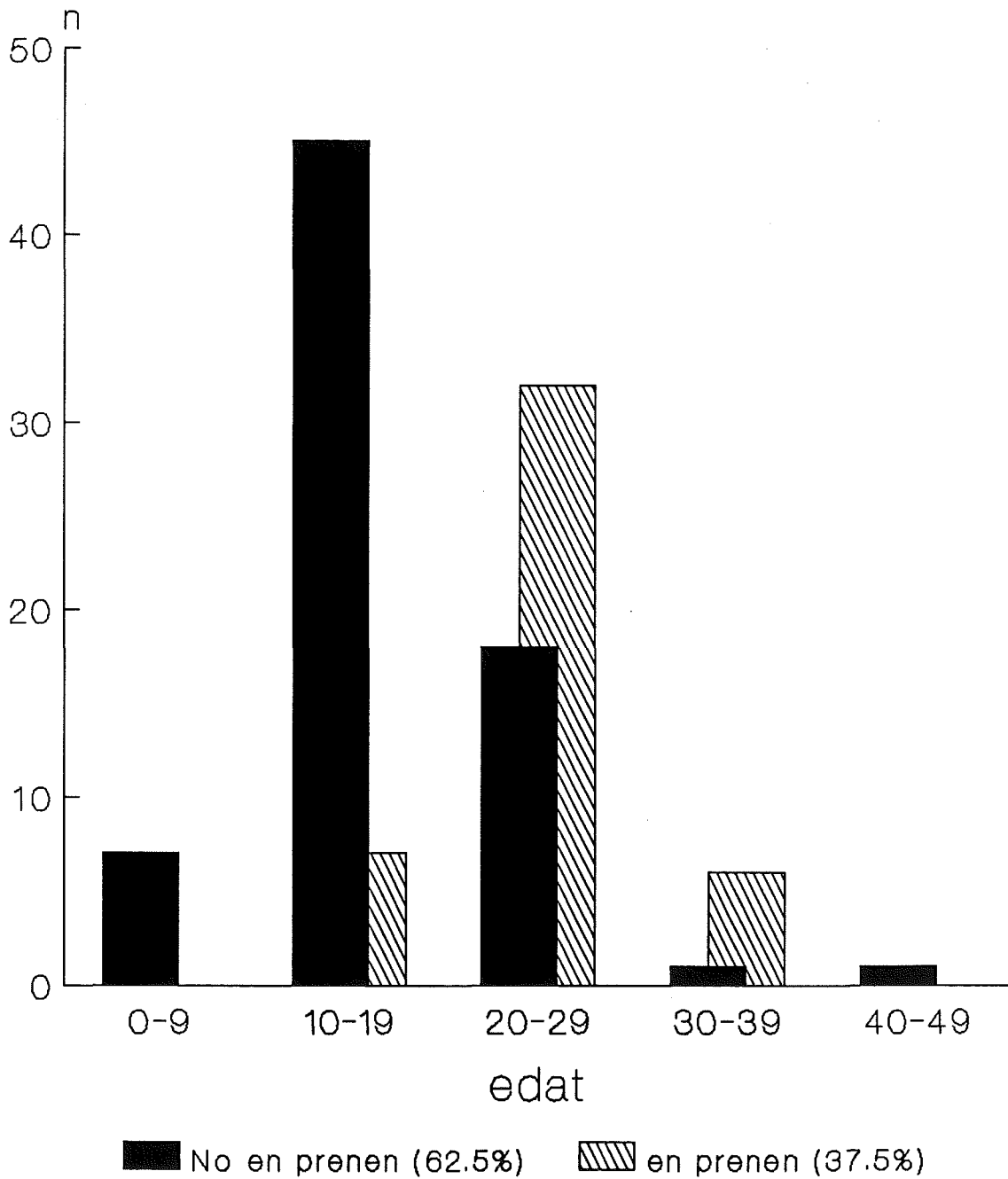


Figura 4.- Relació entre el consum de cafè i l'edat en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

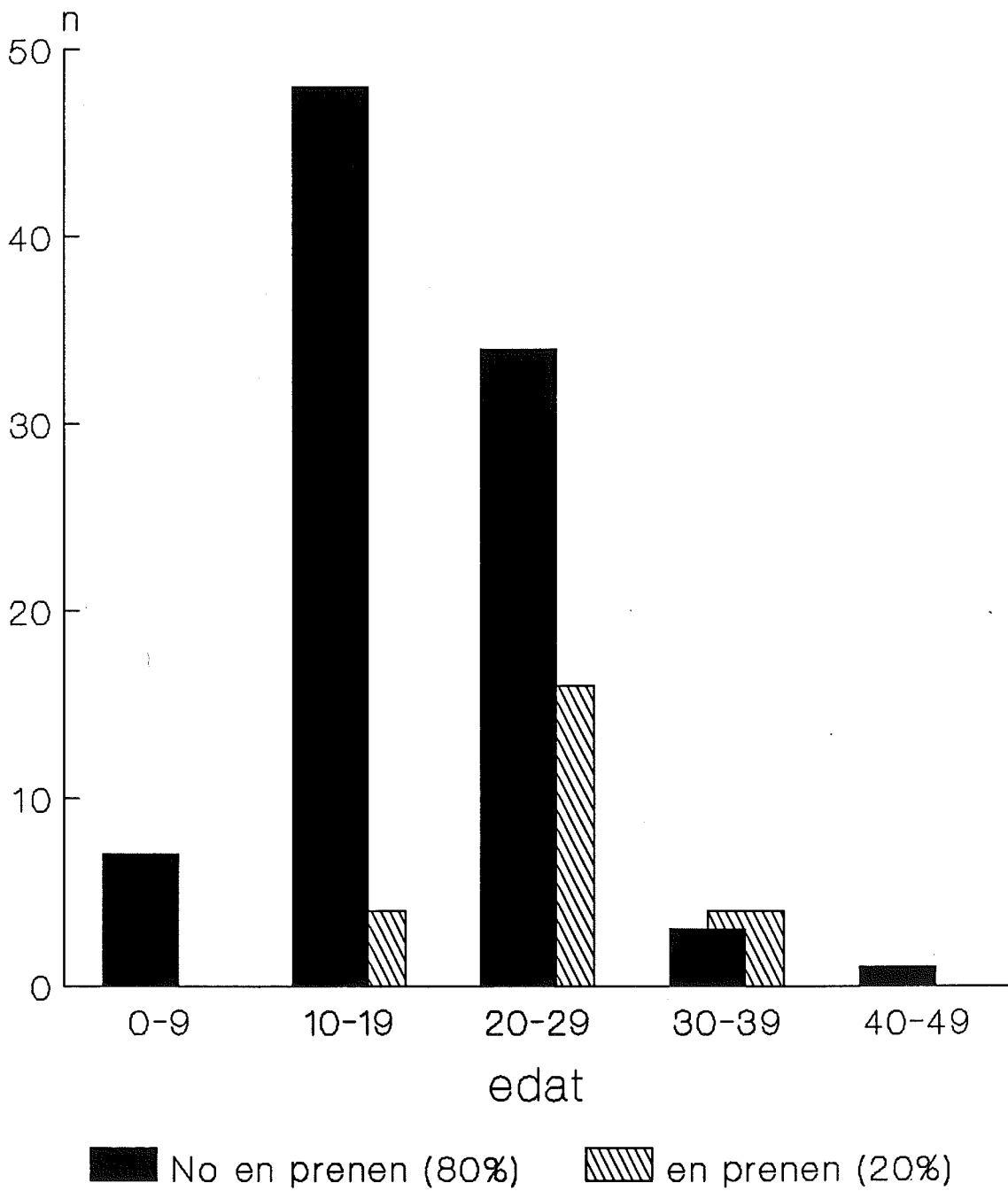


Figura 5.- Relació entre el consum d'alcohol i l'edat en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

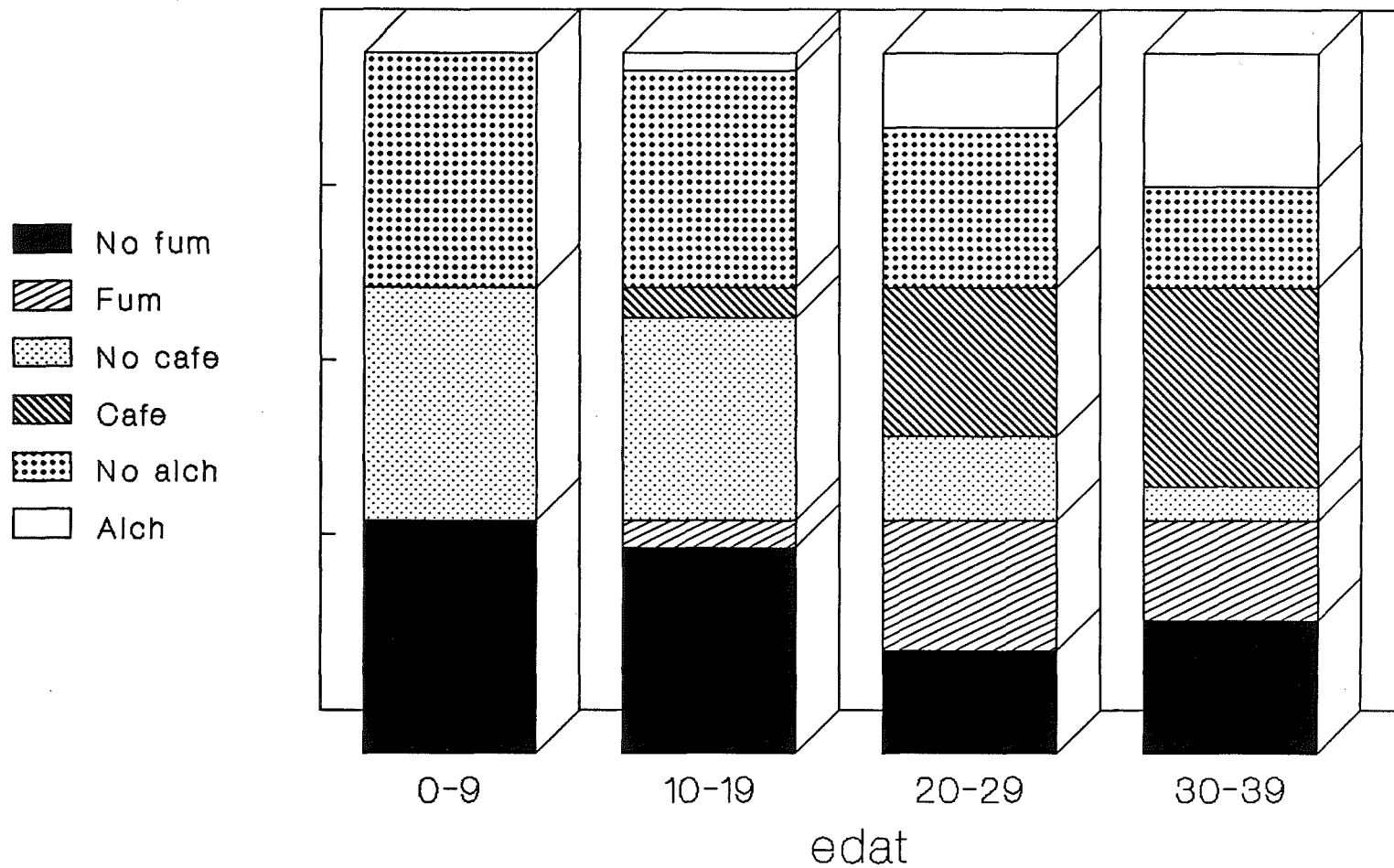


Figura 6.- Relació de l'edat amb els hàbits tòxics en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida. No s'inclou el grup de 40 a 49 anys perquè tenia molt pocs efectius (només un individu).

Taula 5.- Consum de cafè (nombre de tasses al dia) en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

	mitjana \pm D.E.	2,3 \pm 1,3	
	mediana	2	
	moda	2	
	mínim = 1; màxim = 6		
	biaix	1,2	
	no en prenen	en prenen	
	62,5%	37,5%	
Quartils	25%	50%	75%
	1	2	3

Taula 6.- Consum d'alcohol (g per setmana) en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

mitjana \pm D.E.	135,5 \pm 133,9		
mediana	56		
moda	40		
mínim = 8; màxim = 500			
biaix	1,15		
	no en prenen		en prenen
	80%		20%
Quartils	25%	50%	75%
	30	56	225

Un cop determinada la relació entre l'acetilisoniazida (AcINH) i la isoniazida (INH) (vegeu la taula 7), el logaritme de la relació AcINH/INH es distribueix de manera clarament bimodal (vegeu la figura 7), amb una antimoda en el valor de $\log \text{AcINH/INH}$ de 0,15, que correspon a una raó metabòlica d'un valor d'1,43. Aquest punt de tall de la distribució de la mostra d'acetiladors també es pot objectivar en la representació de pròbits acumulats de la mateixa (vegeu la figura 8). Si s'aplica a aquesta distribució el test de normalitat de Kolmogorov-Smirnoff, es pot constatar que no s'ajusta a la distribució normal ($p = 0,001$). Segons això, i com ja s'ha descrit en altres treballs, aquesta antimoda de la distribució determina dues subpoblacions diferenciades: acetiladors lents, amb raons metabòliques AcINH/INH inferiors a 1,43, i acetiladors ràpids, amb valors superiors a l'esmentat.

Segons aquest criteri, un 65,1% (82) dels individus de la nostra mostra es poden qualificar com a acetiladors lents i un 34,9% (44) com a ràpids. En el punt d'unió de les dues distribucions es pot definir una tercera subpoblació que en la literatura es defineix com a acetiladors inter-

Taula 7.- Log AcINH/INH en la mostra de població en què s'ha determinat el fenotip acetilador de la isoniazida.

mitjana \pm D.E.	-0,04 \pm 0,04		
mediana	-0,21		
moda	-0,29		
mínim = -0,85; màxim = 0,91			
biaix	0,48		
<hr/>			
	lents	ràpids	
	<hr/>	<hr/>	
	65,1%	34,9%	
<hr/>			
	lents	intermedis	ràpids
	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	64,3%	0,8%	34,9%
<hr/>			
Quartils	25%	50%	75%
	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	-0,36	-0,21	0,41
<hr/>			