

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/4326**  
**IB/80506**

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1980*

NO 506

CÉLIA REGINA GARLIPP

ESTUDO DO FENÓTIPO ACETILADOR DA ISONIAZIDA EM PAULISTAS  
DESCENDENTES DE JAPONESES

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da UNICAMP para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Biologia

SM

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO SERGIO RAMALHO

BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
UNICAMP

CAMPINAS

-1980-

|           |       |
|-----------|-------|
| Classif.  | T     |
| Author    | 61842 |
| V.        | Ex.   |
| Ex.       |       |
| Tombo EE/ | 4326  |
| IB/465.   |       |

1B/ 80506

34 4326

Aos meus Pais

### AGRADECIMENTOS

- Prof. Dr. Bernardo Beiguelman  
Universidade Estadual de Campinas
  
- Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho  
Universidade Estadual de Campinas
  
- Dr. João Antonio Vozza  
Casa de Saúde de Campinas
  
- Dr. José Antonio Padovan  
Sanatórios de Campos de Jordão
  
- Sr. Júlio Ishii  
Sanatório Sírio, Campos do Jordão, SP.
  
- Maria Carolina dos Santos  
Laboratório de Patologia Clínica - UNICAMP

## ÍNDICE

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO .....                 | 01 |
| OBJETIVO .....                   | 13 |
| CASUÍSTICA e MÉTODO .....        | 15 |
| RESULTADOS .....                 | 19 |
| DISCUSSÃO .....                  | 22 |
| CONCLUSÕES .....                 | 27 |
| RESUMO .....                     | 29 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 30 |

## INTRODUÇÃO

A isoniazida, mais conhecida por INH (do inglês isonicotinyl-hidrazine), é uma droga largamente usada na quimioterapia e na quimioprevenção da tuberculose, recebendo dezenas de diferentes nomes comerciais\*.

Segundo GOODMAN e GILMAN (1978), a descoberta da isoniazida foi algo fortuita.

Em 1945, constatou-se que a nicotinamida possuía ação tuberculostática. O exame de compostos correlatos da nicotinamida revelou que muitos derivados da piridina também possuíam acentuada atividade contra o bacilo da tuberculose. Entre esses, estavam congêneres do ácido isonicotínico, sendo que a isonicotinil-hidrazida (isoniazida) foi a que

---

\* Nomes comerciais da isoniazida: Rimitsida, Tibizida, Cedin, Hizid, Isonicida, Isonicotan, Tubazida, Isonilex, Nicetal, Nikazida, Nitadon, Tisiodrazida, Tizida, Isozida, Tekazim, Isidrina, Hidrazida, Nevin, Cotinazin, Dinavin, Ditubin, Mibasan, Neoteben, Niadrin, Nicozida, Nidrazida, Nidaton, Nicizina, Nicotibina, Piricidin, Isobin, Pirizidin, Rimifon, Isonizida, Tubicon, Tivid, Tisin, Tibinida, Tulcomel, Tubeco, Vazadrina, Vederon e Zinadon, entre outros (INDEX MERCK, 1976).

mostrou a mais forte ação tuberculostática, mais potente do que qualquer outro agente sintético ou antibiótico conhecido (FOX, 1952).

A isoniazida, cuja fórmula química é  $C_6H_7N_3O$ , é um pó cristalino branco, inodoro, francamente solúvel em água.

O seu mecanismo exato de ação é desconhecido. Dentre os modelos de ação sugeridos até o momento, vale a pena citar a possibilidade de ação sobre os lípidos da parede do Micobacterium tuberculosis, que são essenciais à sua viabilidade, a inibição da síntese de ADN e ARN, o efeito sobre a glicólise, reduzindo o conteúdo de carboidratos do bacilo da tuberculose, a inibição da biossíntese do ácido micólico e a combinação com uma enzima dos bacilos sensíveis (vide referências em GOODMAN e GILMAN, 1978).

A isoniazida é rapidamente absorvida quando administrada por via oral ou parenteral. Ela se difunde rapidamente em todos os líquidos e células do organismo e está presente, em diferentes concentrações, em todos os órgãos humanos.

A sua inativação se processa no fígado, por intermédio de uma reação irreversível catalisada por uma acetiltransferase, que a transforma em acetilisoniazida (EVANS e WHITE, 1964; PETER et al, 1965).

De 75% a 95% da INH administrada são eliminados na urina em 24 horas (GOODMAN e GILMAN, 1978). Parte da substância está presente na urina sob forma inalterada, em porcentagem variável de um indivíduo para outro, como se discutirá adiante. Embora os principais produtos de eliminação sejam a acetilisoniazida e o ácido isonicotínico, também são identificáveis na urina pequenas quantidades de um conjugado do ácido isonicotínico, provavelmente o ácido isonicotinúrico, uma ou mais isonicotinoil-hidrazonas e traços de N-metilisoniazida. A depuração renal da isoniazida depende em pequeno grau do estado funcional do rim. Por essa razão, pequenas disfunções renais não estão associadas com risco apreciavelmente mais elevado de toxicidade medicamentosa.

Os estudos de BÖNICKE e LISBOA (1957, 1961), feitos em gêmeos, demonstraram que a capacidade de inativação da INH é uma constante individual determinada geneticamente. Além disso, os estudos de famílias permitiram estabelecer a hipótese de que a inativação da isoniazida é determinada por um par de genes autossômicos, existindo um alelo determinador de inativação lenta e um alelo determinador da inativação rápida da isoniazida (KNIGHT et al, 1959; EVANS et al, 1960).

Na maioria dos estudos populacionais a respeito da capacidade de inativação da isoniazida foram obtidas distribuições bimodais, ou seja, os indivíduos examinados foram classificados como inativadores lentos ou como inativadores rápidos da INH. Os inativadores lentos (fenótipo reces-

sivo) estariam representados pelos homozigotos de um gene autossômico recessivo (genótipo aa), enquanto os inativadores rápidos (fenótipo dominante) estariam representados pelos heterozigotos Aa e pelos homozigotos AA. Cumpre ressaltar, no entanto, que alguns autores, usando técnicas laboratoriais mais sofisticadas, conseguiram detectar os heterozigotos desses genes (SUNAHARA et al, 1961a, b; ELLARD et al, 1973).

Como a inativação da isoniazida é feita por intermédio da sua acetilação hepática, as expressões acetilador lento e acetilador rápido da INH são consideradas como sinônimas, respectivamente, de inativador lento e inativador rápido da INH. É fácil concluir, por outro lado, que a velocidade de inativação da INH depende, fundamentalmente, da atividade da acetiltransferase hepática.

Como comentam BEIGUELMAN, RAMALHO, ARENA e GARLIPP (1977), o reconhecimento dos acetiladores lentos e rápidos da INH tem importância prática notável na quimioterapia e na quimioprofilaxia da tuberculose. Isso porque tem-se como certo, atualmente, que os acetiladores lentos, quando submetidos a tratamento contínuo com INH, têm probabilidade cerca de seis vezes maior do que os rápidos de manifestar reações tóxicas, geralmente traduzidas por neurite periférica. Essa neurite pode ser acompanhada, mais raramente, de perturbações mentais ou de sudorese intensa e rubor. As complicações neurológicas provocadas pela INH nos acetiladores lentos incluem fraqueza muscular nos membros, perda dos reflexos aquiliano e patelar, perda da sensação tátil, analgesia e perda da sensa

ção de posição dos artelhos (DEVADATTA et al, 1960).

Por outro lado, também está estabelecido que na quimioterapia intermitente com INH e estreptomicina , ministradas uma vez por semana, a qual é mais econômica, mais eficiente e mais conveniente para os pacientes e para o clínico, os acetiladores rápidos da INH respondem menos satisfatoriamente do que os lentos (TUBERCULOSIS CHEMOTHERAPY CENTRE, MADRAS, 1970, 1973, apud BEIGUELMAN et al, 1977). Foi por essa razão, aliás, que se propôs que os pacientes acetiladores rápidos recebessem a INH em uma preparação de liberação lenta, a fim de que, neles, o tratamento intermitente também alcançasse sucesso (EIDUS et al, 1974).

Foram descritos na literatura vários casos de pacientes medicados com isoniazida que desenvolveram ' quadro de hepatite fulminante, sobretudo quando havia administração concomitante de determinados antibióticos e anestésicos gerais (BLACK et al, 1975; METREAU, 1976; NELSON et al, 1976; PESSAYRE et al, 1977, entre outros). Partindo-se da hipótese de que esse efeito hepatotóxico dependia, fundamentalmente, de um derivado da acetilisoniazida, a monoacetil-hidrazina, sugeriu-se que os acetiladores rápidos da INH estariam mais sujeitos a apresentar hepatite. Estudos mais recentes têm demonstrado, contudo, que tanto os acetiladores rápidos quanto os acetiladores lentos estão expostos a concentrações similares de monoacetil-hidrazina após a ingestão de INH. Consequentemente, o risco de desenvolver hepatite tóxica talvez seja igual nos dois grupos (ELLARD et al, 1978).

Por outro lado, está comprovado que os acetiladores lentos estão mais sujeitos a apresentar incoordenação e sedação excessiva quando medicados concomitantemente com INH e difenil-hidantoína (KUTT et al., 1976). Isso se deve ao fato de a isoniazida inibir a para-hidroxilação desse anticonvulsivante.

A determinação do fenótipo acetilador da isoniazida pode ser feita por intermédio de diversas técnicas laboratoriais. Muitas dessas técnicas baseiam-se na medida dos níveis sanguíneos de INH seis horas após a ingestão de doses variáveis desse medicamento (vide referências em BEIGUELMAN, 1979).

DEVADATTA e col. (1960) determinaram o fenótipo acetilador da isoniazida medindo os níveis plasmáticos de INH quatro horas e meia após a injeção intramuscular de 3 mg desse medicamento por kg de peso corporal. Já SUNAHARA e col. (1961, 1963) padronizaram um teste microbiológico de difusão vertical, no qual os níveis de INH são medidos seis e oito horas após a ingestão de 4 mg desse medicamento por kg de peso corporal.

Como a sulfametazina é acetilada de modo semelhante à INH, EVANS (1969) sugeriu que o fenótipo acetilador da isoniazida fosse investigado através da dosagem de sulfametazina livre e da acetilada no soro e na urina do paciente, oito horas após a ingestão de 160 mg desse medicamento por kg de massa metabolicamente ativa.

Como se vê, as técnicas laboratoriais disponíveis para a determinação do fenótipo acetilador da isoniazida são muitas. No entanto, a maioria dessas técnicas são excessivamente complexas para o uso clínico, na rotina de hospitais e ambulatorios.

EIDUS e col. (1973) e HODGKIN e col. (1974) descreveram um teste colorimétrico simples para a determinação do fenótipo acetilador da isoniazida que veio justamente resolver esse problema, mostrando-se bastante apropriado para o uso clínico. O princípio desse teste é determinar, como se verá com mais detalhes adiante, o percentual de isoniazida acetilada in vivo, presente na urina 8 horas após a ingestão de 10 mg desse medicamento por kg de peso corporal.

A frequência de acetiladores lentos da INH nas populações caucasóides européias e da América do Norte, bem como nas populações negróides africanas e norte americanas, varia geralmente entre 50% e 60% (MOTULSKY, 1964; VIZNEROVÁ et al., 1973; BEIGUELMAN et al., 1977).

No Brasil, a frequência de acetiladores lentos e rápidos da INH foi investigada pelo método descrito por EIDUS e col. (1973) e por HODGKIN e col. (1974) em pacientes tuberculosos caucasóides e negróides do Estado de São Paulo, podendo-se estimar que 57% dos caucasóides e 50% dos negróides são acetiladores lentos (BEIGUELMAN, RAMALHO, ARENA e GARLIPP, 1977).

Essas proporções são, pois, muito semelhantes às verificadas por outros autores nas populações caucasóides da Europa e da América do Norte e nas populações negróides norte americanas e africanas. Por outro lado, a frequência do gene responsável pela acetilação lenta da INH ( $q = \sqrt{0,57} = 0,755$  entre os caucasóides e  $q = \sqrt{0,50} = 0,707$  entre os negróides) mostrou-se, nas duas amostras brasileiras, muito próxima da frequência média desse gene estimada em populações caucasóides e negróides (0,75).

Na figura 1, são apresentados os histogramas das distribuições de pacientes caucasóides e negróides brasileiros tuberculosos, segundo o percentual de isoniazida que acetilaram in vivo, 8 horas após a ingestão de 10 mg desse medicamento por kg de peso corporal. Nesses histogramas é fácil constatar que a antimoda coincide com o intervalo entre 60% e 65% nos caucasóides e entre 60% e 70% entre os negróides. Por isso, é bastante plausível aceitar que os percentuais de isoniazida acetilada iguais ou superiores a 65% sirvam para classificar como acetiladores rápidos, tanto os pacientes caucasóides quanto os negróides. Em oposição, os acetiladores lentos devem incluir aqueles que apresentarem percentuais de isoniazida acetilada inferiores a 65%.

A frequência de acetiladores lentos da isoniazida tem se mostrado, em todas as populações mongolóides nas quais foi investigada, menor do que aquelas geralmente descritas entre caucasóides e negróides. Assim, em tailandeses, essa frequência é da ordem de 33% (SUNAHARA et al. ,

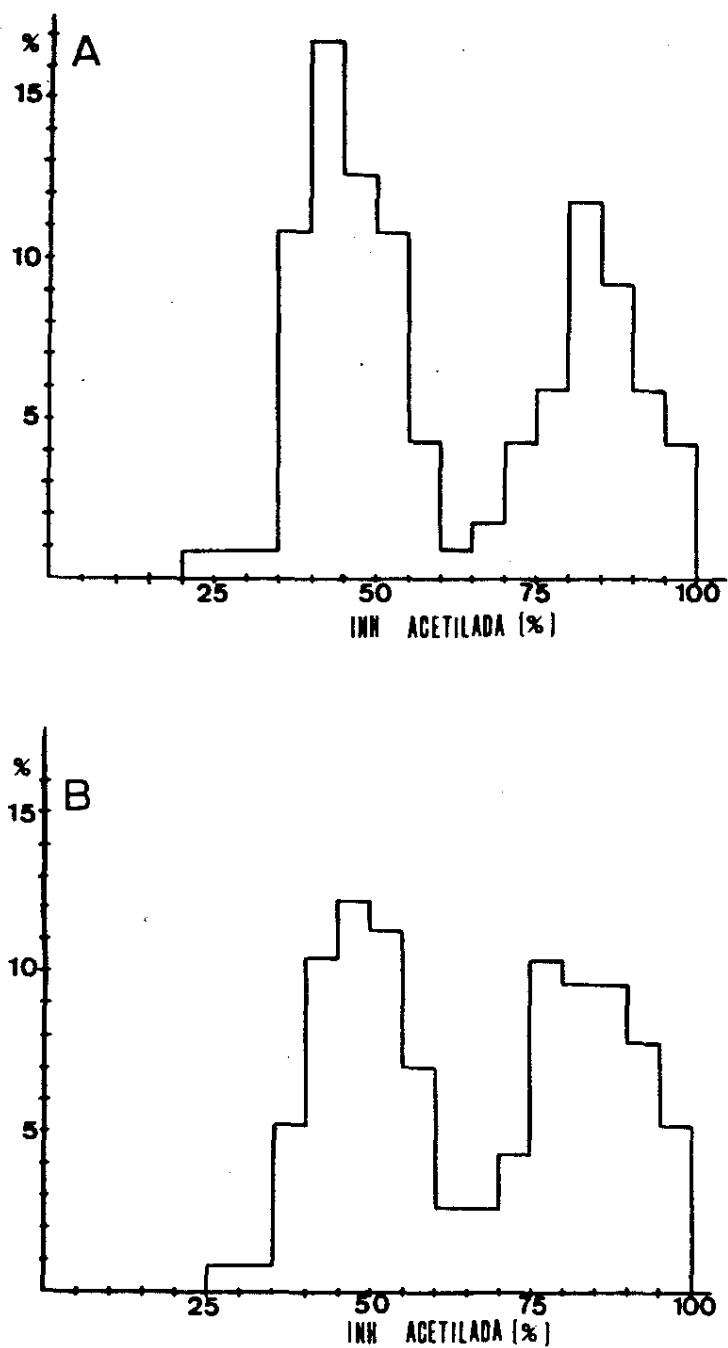


Fig. 1 - Histograma das distribuições de 119 caucasóides (A) e 115 negróides (B) brasileiros tuberculosos, segundo percentual de isoniazida que acetilaram in vivo, 8 horas após a ingestão de 10 mg desse medicamento por kg de peso corporal (BEIGUELMAN, RAMALHO, ARENA e GARLIPP, 1977).

1963), diminuindo para 22,4% entre chineses (SUNAHARA et al., 1963), 20% entre os índios da América do Norte (MOTULSKY, 1964), 11,5% entre japoneses (SUNAHARA et al., 1961) e chegando a 5% entre os esquimões (MOTULSKY, 1964).

Nas populações resultantes da miscigenação de caucasóides e mongolóides a frequência de inativadores lentos da INH varia com o grau de miscigenação. Assim, por exemplo, entre mexicanos com miscigenação índia, a frequência de inativadores lentos da INH é de cerca de 30% (MOTULSKY, 1964).

Tendo em mente o fato de que grande contingente da população paulista é constituído por descendentes de imigrantes do Extremo Oriente, o grupo de trabalho de Farmacogenética do Departamento de Genética Médica da UNICAMP julgou importante estender as investigações a respeito da capacidade de inativação da isoniazida a esses indivíduos, examinando uma amostra de descendentes de japoneses internados para tratamento de tuberculose no Sanatório São Francisco Xavier, de Campos do Jordão, SP (RAMALHO, BEIGUELMAN e GARLIPP, 1977; RAMALHO, 1979). Apesar de ter sido empregada exatamente a mesma metodologia usada anteriormente no estudo de caucasóides e negróides, ou seja, o método descrito por EIDUS e col. (1973) e por HODGKIN e col. (1974), o histograma da distribuição dos 90 descendentes de japoneses examinados mostrou-se completamente diferente (Fig. 2) (RAMALHO, 1979). De fato, observando-se a figura 2, salta à vista que o percentual de isoniazida acetilada in vivo igual a 65% não permitiu classificar

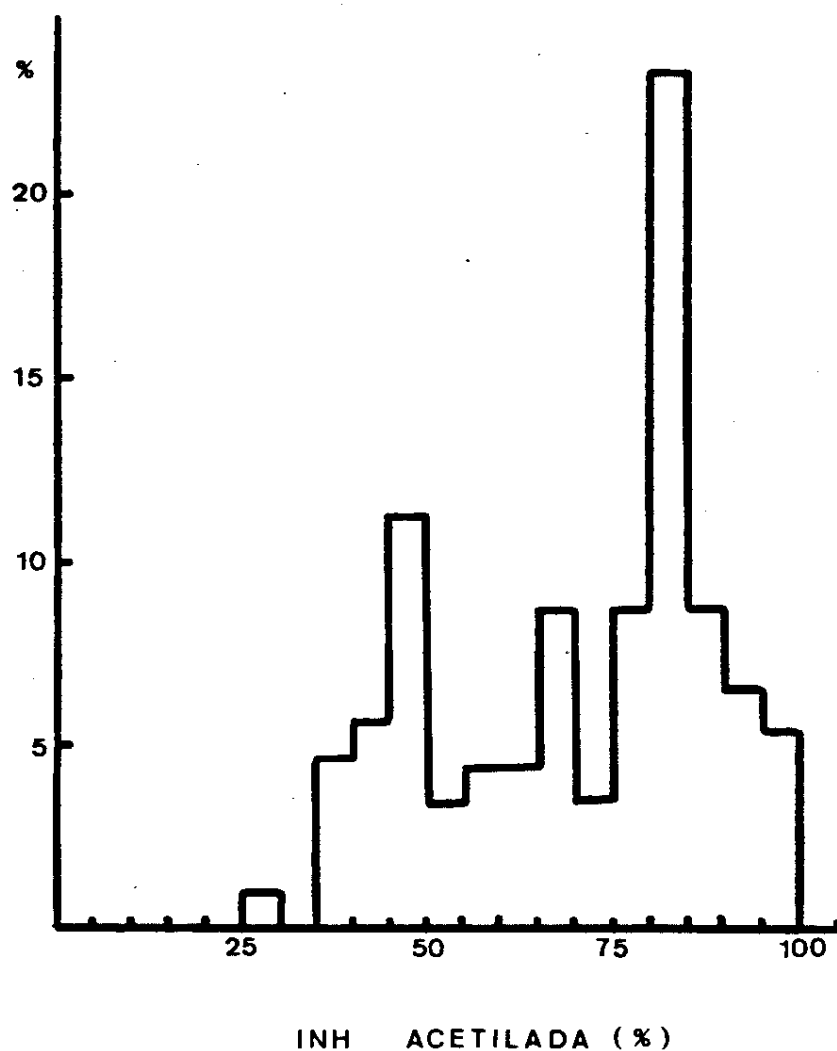


Fig. 2 - Histograma da distribuição de 90 descendentes de japoneses, segundo o percentual de isoniazida que acetilaram in vivo, 8 horas após a ingestão de 10 mg desse medicamento por kg de peso corporal ( RAMALHO, 1979).

os descendentes de japoneses em acetiladores rápidos e lentos, como havia acontecido com os caucasóides e negróides.

Cumpre ressaltar que, pela lei de Hardy e Weinberg, os acetiladores "intermediários" observados nesse estudo nada têm a ver com os verdadeiros acetiladores intermediários verificados por SUNAHARA e col. (1961a,b; 1963).

Embora algumas hipóteses já pudessem ser aventadas para explicar a distribuição obtida, julgou-se preferível aguardar novos estudos a respeito do assunto, que permitissem conclusões mais definitivas. Além disso, foi sugerido investigar, tomando por base os dados obtidos, se com a utilização de modificações da técnica laboratorial descrita por EIDUS e col. (1973) e por HODGKIN e col. (1974), não seria possível classificar os descendentes de japoneses quanto à capacidade de inativação da isoniazida.

### OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo dar continuidade ao estudo da capacidade de inativação da isoniazida em descendentes de japoneses do Estado de São Paulo, testando uma modificação da técnica laboratorial de EIDUS e col. (1973) e de HODGKIN e col. (1974).

Como se comentou na parte introdutória deste trabalho, a técnica laboratorial de EIDUS e col. (1973) e de HODGKIN e col. (1974), apesar de ser uma das mais apropriadas para uso clínico e de fornecer excelentes resultados quando aplicada em caucasóides e negróides, não se mostrou, no trabalho de RAMALHO (1979), muito apropriada para classificar os paulistas descendentes de japoneses quanto ao fenótipo acetilador da isoniazida.

A vantagem de se tentar a classificação dos descendentes de japoneses por intermédio de uma pequena modificação da técnica original de EIDUS e col. (1973) e de HODGKIN e col. (1974) parece óbvia. De fato, se essa modifica

ção técnica também fornecesse bons resultados em descendentes de japoneses, os hospitais e ambulatorios paulistas de tuberculose poderiam usar praticamente a mesma técnica básica para determinar o fenótipo acetilador da isoniazida de pacientes caucasóides, negróides e mongolóides.

O grupo de trabalho de Farmacogenética do Departamento de Genética Médica da UNICAMP foi unânime em concordar que a modificação técnica mais interessante a ser testada seria aumentar o intervalo de tempo entre a ingestão da INH e a determinação do percentual de isoniazida acetilada in vivo presente na urina. Assim sendo, decidiu-se no presente trabalho, colher a amostra de urina a ser examinada 10 horas após a ingestão da isoniazida, em lugar das 8 horas preconizadas na técnica original.

### CASUÍSTICA E MÉTODO

Foram examinados 88 descendentes não miscigenados de japoneses (55 homens e 33 mulheres), com idades variando entre 13 e 76 anos, procedentes de seis sanatórios da cidade de Campos do Jordão, SP (Sanatório São Francisco Xavier, Sanatório São Paulo, Sanatório Santa Cruz, Sanatório Sírrio, Sanatório Nossa Senhora das Mercês e Sanatório São Cristovão).

Julgou-se conveniente examinar uma amostra de descendentes não miscigenados de japoneses para que os dados obtidos pudessem ser comparados mais facilmente com aqueles observados no Japão.

Como já se comentou anteriormente, usou-se uma modificação da técnica de EIDUS e col. (1973) e de HODGKIN e col. (1974), determinando-se o percentual de isoniazida acetilada in vivo presente na urina 10 horas após a ingestão de 10 mg de isoniazida por kg de peso corporal.

Os pacientes ingeriram a dose de isoniazi

da às 6 horas da manhã. Oito horas após, eles esvaziaram completamente a bexiga, desprezando-se essa urina. Duas horas depois disso, ou seja, às 16 horas, eles urinaram novamente, colhendo-se uma amostra dessa urina para exame ("urina de 10 horas"). Foi nessa amostra que se determinou a proporção de isoniazida que foi acetilada in vivo.

Para cada paciente foram usados 4 tubos de ensaio, designados por  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  e  $B_2$ . Os tubos A foram usados para a determinação da quantidade de isoniazida acetilada in vivo, enquanto os tubos B foram usados para a determinação do total de hidrazinas, ou seja, da quantidade de isoniazida acetilada in vivo somada à quantidade de isoniazida acetilada artificialmente in vitro. Essa acetilação in vitro foi conseguida, como se verá adiante, pela adição de anidrido acético.

Assim, foram pipetados no tubo  $A_1$ , 1 ml de urina e 1,5 ml de ácido clorídrico 1N e, no tubo  $B_1$ , 1 ml de urina, 1 ml de água destilada e 0,5 ml de ácido clorídrico 1N (fase de acidificação).

Depois de misturar e aguardar 15 minutos, foram pipetados no tubo  $A_1$ , 7,5 ml de água destilada e, no tubo  $B_1$ , 0,05 ml de anidrido acético e 7,45 ml de água destilada (fase de acetilação in vitro no tubo  $B_1$ ).

Transferiu-se, em seguida, 1 ml da solução do tubo  $A_1$  para o tubo  $A_2$  e 1 ml da solução do tubo  $B_1$  para o tubo  $B_2$ . Foram pipetados, a seguir, tanto no tubo  $A_2$  quan

to no B<sub>2</sub>, 1 ml de cianeto de potássio a 4% e 4,8 ml de cloramina T a 1,6%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 10 minutos (fase de desenvolvimento de cor).

No tubo A<sub>2</sub> houve produção de cor rósea ou vermelho claro, enquanto no tubo B<sub>2</sub> houve a produção de cor vermelha. Parece desnecessário enfatizar que a intensidade da cor obtida foi proporcional à quantidade de isoniazida acetilada presente no tubo.

O percentual de INH acetilada in vivo foi determinado a partir da razão entre as densidades ópticas, a 550 nm, da amostra acetilada in vivo (A<sub>2</sub>) e da totalmente acetilada in vitro (B<sub>2</sub>), multiplicada por 100.

Tendo em vista que, tanto a glicose urinária quanto certos medicamentos, como, por exemplo, a vitamina B<sub>6</sub>, a ciclosserina e a clorpromazina, interferem na estimativa da acetilisoniazida urinária (EIDUS et al., 1973), teve-se o cuidado de não incluir na presente amostra pacientes diabéticos ou que estivessem tomando ácido paraminossalicílico, e de suspender a ministração de vitaminas durante as 24 horas que antecederam os testes. Além disso, a INH foi ingerida pelos pacientes no mínimo 15 horas depois de eles terem tomado qualquer outra medicação eventualmente prescrita (terizidona, etambutol, etionamida e morfazinamida, entre os específicos, e kanamicina, lincomicina, ampicilina, sulfametoxazol, trimetoprima, anfotericina B, sulfametoxipiridazina, dexametasona e hidrocortizona, entre os não específicos). De qualquer modo,

verificou-se, antes, que nenhum desses medicamentos produz re  
ação colorida com os reativos do teste. Tais cuidados foram  
tomados apenas para evitar eventuais interferências metabóli-  
cas com a INH.

### RESULTADOS

A tabela I e a figura 3 mostram a distribuição dos descendentes de japoneses segundo o percentual de acetilisoniazida presente na urina 10 horas após a ingestão de uma dose única de 10 mg de INH por kg de peso corporal.

Tanto no histograma da figura 3, quanto nos dados da tabela I, é fácil constatar a existência de dois grupos principais de indivíduos, intercalados por um grupo "intermediário", representado por um percentual pequeno de pacientes.

A grande maioria dos indivíduos examinados (89,8%) apresentou percentuais de acetilisoniazida iguais ou superiores a 70%. Seis pacientes (6,8%) acetilaram in vivo menos de 50% da INH ingerida, enquanto que apenas 3 pacientes (3,4%) apresentaram percentuais de acetilisoniazida entre 55% e 65%.

Tabela I - Distribuição de 88 japoneses tuberculosos segundo o percentual de isoniazida que acetilaram in vivo 10 horas após a ingestão de 10 mg desse medicamento por kg de peso corporal.

| PERCENTAGEM DE<br>ACETILAÇÃO | P A C I E N T E S |             |
|------------------------------|-------------------|-------------|
|                              | NÚMERO            | PERCENTAGEM |
| 35 - 40                      | 3                 | 3,4         |
| 40 - 45                      | 2                 | 2,3         |
| 45 - 50                      | 1                 | 1,1         |
| 50 - 55                      | -                 | -           |
| 55 - 60                      | 2                 | 2,3         |
| 60 - 65                      | 1                 | 1,1         |
| 65 - 70                      | -                 | -           |
| 70 - 75                      | 1                 | 1,1         |
| 75 - 80                      | 5                 | 5,7         |
| 80 - 85                      | 14                | 15,9        |
| 85 - 90                      | 14                | 15,9        |
| 90 - 95                      | 26                | 29,6        |
| 95 - 100                     | 19                | 21,6        |
| TOTAL                        | 88                | 100         |

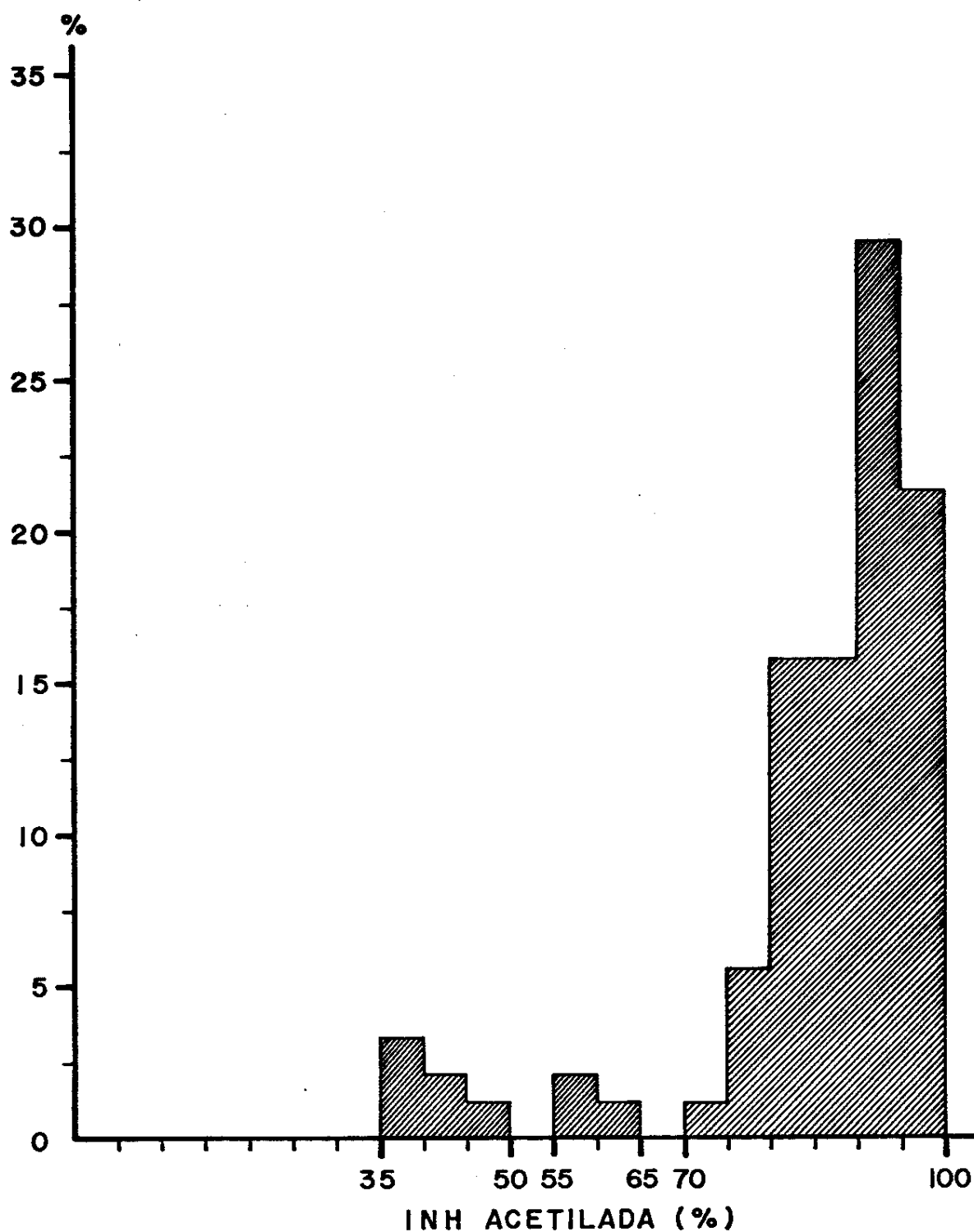


Fig. 3 - Histograma da distribuição de 88 descendentes não miscigenados de japoneses tuberculosos, segundo o percentual de isoniazida que acetilaram in vivo, 10 horas após a ingestão de 10 mg desse medicamento por kg de peso corporal.

### DISCUSSÃO

Ao analisar os resultados obtidos, chama a atenção o fato de a modificação técnica utilizada permitir uma classificação mais fácil dos descendentes de japoneses quanto ao fenótipo acetilador da isoniazida, do que quando se usa a técnica original de EIDUS e col. (1973) e de HODGKIN e col. (1974). Realmente, embora tenha aparecido um pequeno grupo "intermediário", a amostra foi claramente subdividida em dois grupos principais, bastante distintos (Fig. 3).

Parece não haver dúvida que os indivíduos que apresentaram percentuais de acetilisoniazida iguais ou superiores a 70% são acetiladores rápidos da INH. Esses pacientes perfizeram 89,8% da amostra total.

Da mesma forma, salta à vista que os mongolóides que acetilaram in vivo menos que 50% da INH ingerida são acetiladores lentos da INH.

Torna-se mais difícil, no entanto, classificar os três pacientes que apresentaram percentuais de ace-

tilisoniazida entre 55% e 65%. Pela lei de Hardy e Weinberg, é evidente que esses indivíduos nada têm a ver com os verdadeiros acetiladores intermediários verificados por SUNAHARA e col. (1961a, b, 1963) em populações mongolóides, ou seja, com os heterozigotos do gene da inativação lenta da INH. Cumpre ressaltar, aliás, que a técnica laboratorial utilizada por esses autores, ou seja, o método microbiológico de difusão vertical, é muito mais sensível do que a técnica de determinação do percentual de acetilisoniazida na urina, embora pouco aplicável para fins clínicos.

Considerando, entretanto, a pequena frequência desses acetiladores "intermediários" na amostra analisada (3 indivíduos em 88, ou seja, 3,4%) e a falta de uma classificação genotípica para eles, parece pouco consistente querer imaginá-los constituindo um grupo à parte.

Uma das alternativas mais viáveis e que, na verdade, traria poucas modificações do ponto de vista prático, seria considerá-los também como acetiladores lentos da INH. Poderíamos dizer, então, que a frequência de acetiladores lentos foi de 10,2% na amostra analisada.

Transpondo esses dados para a população, poderíamos estimar a frequência de acetiladores lentos da INH entre os paulistas descendentes não miscigenados de japoneses em aproximadamente 10%. Obviamente, a frequência de acetiladores rápidos poderá ser estimada como sendo aproximadamente 90%.

Isso permitirá, por sua vez, que se estime a frequência dos alelos determinadores da acetilação lenta (q) e da acetilação rápida ( $p = 1 - q$ ) entre os descendentes de japoneses como sendo  $q = \sqrt{10,2\%} = 31,94\%$  e  $p = 68,06\%$ , com desvio padrão de 5%, calculado a partir de  $\sqrt{\frac{1 - q^2}{4n}}$ , sendo n o tamanho da amostra.

Admitindo a população em equilíbrio de Hardy e Weinberg, isto é, que os homozigotos do gene da acetilação rápida, os heterozigotos e os homozigotos do gene da acetilação lenta se distribuem segundo  $p^2$ ,  $2pq$  e  $q^2$ , tem-se também que, dos 89,8% acetiladores rápidos ( $p^2 + 2pq$ ), 43,48% são heterozigotos ( $2pq$ ) e 46,32% são homozigotos ( $p^2$ ).

A proporção de acetiladores lentos na amostra estudada (10,2%) é muito semelhante à observada no Japão por SUNAHARA e col. (1961b), ou seja, 11,5%.

Por outro lado, é curioso mencionar que, pela modificação técnica adotada, o percentual de acetilisoniazida igual ou superior a 65% também serve para classificar como acetiladores rápidos os descendentes de japoneses (Fig. 3), da mesma forma que acontece com os pacientes caucasóides e negróides, quando se usa a técnica original (Fig. 1).

Caso se prefira, no entanto, uma interpretação mais literal dos dados obtidos no presente trabalho, deixando de classificar os três indivíduos que apresentaram percentuais de acetilisoniazida entre 55% e 65% como acetilado

res lentos, pode-se dizer que a modificação técnica adotada permitiu classificar 85 dos 88 indivíduos examinados (96,59%) da amostra. Dentre esses 85 indivíduos, 79 eram acetiladores rápidos (92,95%) e 6 eram acetiladores lentos (7,05%).

Seria desnecessário comentar que os dados obtidos não podem ser transpostos para os paulistas descendentes miscigenados de japoneses, entre os quais a frequência de acetiladores lentos será, evidentemente, maior. De fato, como já se comentou anteriormente, nas populações resultantes da miscigenação de caucasóides e mongolóides, a frequência de inativadores lentos da INH varia com o grau de miscigenação.

Conhecendo-se, no entanto, a frequência ' do gene de acetilação lenta entre japoneses ( $q_1$ ) e entre caucasóides ( $q_2$ ), pode-se calcular a frequência  $q_m$  da população miscigenada segundo a fórmula  $q_m = xq_1 + (1 - x)q_2$ , na qual,  $x$  representa a proporção em que os japoneses contribuíram para a formação da população miscigenada (BEIGUELMAN, 1977).

Essa fórmula pode ser transformada de modo a permitir a estimativa da proporção  $x$ , a partir de uma população miscigenada (BERNSTEIN, 1931; OTTENSÖÖSER, 1944), isto é, ser escrita como:

$$x = \frac{q_m - q_2}{q_1 - q_2}$$

Ao finalizar esta discussão, seria conveniente lembrar que outras populações brasileiras, sobretudo a paranaense, também receberam um forte contingente de imigran-

4326/IB

tes do Extremo Oriente, e que as populações do Norte e do Nordeste do país receberam um acentuado fluxo gênico de índios.

Assim sendo, torna-se crucial que a investigação do fenótipo acetilador da isoniazida seja estendida tanto aos nortistas e nordestinos, quanto aos outros brasileiros que descendem de imigrantes do Extremo Oriente.

### CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- 1 - A determinação do percentual de acetilisoniazida presente na urina 10 horas após a ingestão de 10 mg de INH por Kg de peso corporal, permite classificar os descendentes de japoneses quanto ao fenótipo acetilador da isoniazida.
- 2 - A frequência de acetiladores lentos da isoniazida entre os paulistas descendentes não miscigenados de japoneses pode ser estimada em, aproximadamente, 10%. Essa frequência é muito semelhante à observada no Japão por SUNAHARA e col. (1961b).
- 3 - As frequências dos alelos determinadores da acetilação lenta (q) e da acetilação rápida da isoniazida (p) entre os paulistas descendentes não miscigenados de japoneses podem ser estimadas como sendo  $q = \sqrt{10,2\%} = 31,94\%$  e  $p = 1 - 31,94\% = 68,06\%$ , com desvio padrão de 5%.

- 4 - Admitindo-se a população em equilíbrio de Hardy e Weinberg, pode-se dizer que dos 90% de acetiladores rápidos, aproximadamente 44% são heterozigotos e 46% são homozigotos.
- 5 - Pela modificação técnica testada no presente trabalho, o percentual de acetilisoniazida igual ou superior a 65% serve para classificar como acetiladores rápidos os descendentes de japoneses, da mesma forma que acontece com os pacientes caucasóides e negróides, quando se usa a técnica original de EIDUS e col. (1973) e de HODGKIN e col. (1974).
- 6 - Caso se prefira uma outra interpretação dos dados obtidos no presente trabalho, deixando de classificar os três indivíduos que apresentaram percentuais de acetilisoniazida entre 55% e 65% como acetiladores lentos, pode-se dizer que a modificação técnica adotada permitiu classificar 96,59% da amostra examinada. Nesse caso, dos 85 indivíduos classificados, 79 eram acetiladores rápidos (92,95%) e 6 eram acetiladores lentos da INH (7,05%).

### RESUMO

O fenótipo acetilador da isoniazida (INH) foi investigado em 88 paulistas descendentes não miscigenados de japoneses internados para tratamento de tuberculose em sanatórios de Campos do Jordão, SP.

Foi utilizada uma modificação da técnica laboratorial recomendada por EIDUS e col. (1973) e HODGKIN e col. (1974), investigando-se o percentual de acetilisoniazida presente na urina 10 horas após a ingestão de 10 mg de INH por kg de peso corporal.

Os resultados obtidos permitiram estimar a frequência de acetiladores lentos da isoniazida entre os paulistas descendentes não miscigenados de japoneses em, aproximadamente, 10%. Essa frequência é muito semelhante à observada por SUNAHARA e col. (1961b) no Japão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. São Paulo, EDART, 1977.
2. BEIGUELMAN, B. Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários em genética e na prática médica. São Paulo, EDART, 1979.
3. BEIGUELMAN, B.; RAMALHO, A.S.; ARENA, J.F.P. & GARLIPP, C. R. Acetilação da isoniazida em brasileiros caucasóides e negróides com tuberculose pulmonar. Rev. Paul. Med., 89: 12-15, 1977.
4. BERNSTEIN, F. Zur Grundlegung der chromosomentheorie der Vererbung beim Menschen mit besonderer Berücksichtigung der Blutgruppen. Z. indukt. Abstamm. u. Vererbungs., 57: 113-138, 1931.
5. BLACK, M.; MITCHELL, J.R.; ZIMMERMAN, H.J.; ISLAK, K.G. & EPTER, G.R. Isoniazid-associated hepatitis in 114 patients. Gastroenterology, 69: 289-302, 1975.

6. BÖNICKE, R. & LISBOA, B.P. Über die Erbbedingtheit der intraindividuellen Konstanz der Isoniazidausscheidung beim Menschen. (Untersuchungen an eineiigen und zweieiigen Zwillingen). Naturwiss, 44: 314, 1957.
7. BÖNICKE, R. & LISBOA, B.P. Vergleichende Untersuchungen über die Isoniazidausscheidung bei eineiigen und zweieiigen Zwillingen. Iber. Borstel., 5: 88-92, 1961.
8. DAVADATTA, S.; GANGADHARAM, P.R.J.; ANDREWS, R.H.; FOX, W.; RAMAKRISHNAN, C.V.; SELKON, J.B. & VELUS, S. Peripheral neuritis due to isoniazid. Bull. Wld. Hlth. Org., 23: 587-598, 1960.
9. EIDUS, L.; HODGKIN, M.M.; HSU, A.H.E. & SCHAFFER, O. Pharmacokinetic studies with an isoniazid slow releasing matrix preparation. Am. Rev. Resp. Dis., 110: 34-42, 1974.
10. EIDUS, L., VARUEHESE, P.; HODGKIN, M.M.; HSU, A.H.E. & McRAE, K.B. Simplification of isoniazid phenotyping procedure to promote its application in the chemotherapy of tuberculosis. Bull. Wld. Hlth. Org., 49: 507-516, 1973.
11. ELLARD, G.A.; GAMMON, P.T. & TITINEN, H. Determination of the acetylator phenotype from the ratio of the urinary excretion of acetylisoniazid: a study on Finish Lapland. Tubercle, 54: 201-210, 1973.

12. ELLARD, G.A.; MITCHISON, D.A.; GIRLING, D.J.; NUNN, A.J. & FOX, W. The hepatic toxicity of isoniazid among rapid and slow acetylators of the drug. Am. Rev. Respir. Dis., 118: 628-629, 1978.
13. EVANS, D.A.P. An improved and simplified method of detecting the acetylator phenotype. J. Med. Genet., 6: 405-407, 1969.
14. EVANS, D.A.P.; MANLEY, K.A. & McKUSICK, V.A. Genetic control of isoniazid metabolism in man. Br. Med. J., 2: 485-491, 1960.
15. EVANS, D.A.P. & WHITE, T.A. Human acetylation polymorphism. J. Lab. Clin. Med., 63: 394-403, 1964.
16. FOX, H.H. Synthetic tuberculostats. III. Isonicotinaldehyde, thiosemicarbazone and some related compounds. J. Org. Chem., 17: 555-562, 1952.
17. GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 5a. edição, 1978.
18. HODGKIN, M.M.; EIDUS, L. & HAMILTON, E.I. Screening of isoniazid inactivators by dilution tes. Bull. Wld. Hlth. Org., 51: 428-430, 1974.

19. The Merck Index. MERCK & CO. INC., Rahway, New Jersey, U.S.A., 9a. ed., 1976.
20. KNIGHT, R.A.; SELIN, M.J. & HARRIS, H.W. Genetic factors influencing isoniazid blood levels in humans. Trans. Conf. Chemoterapy Tuberc. 18<sup>th</sup> Conference. Washington, D.C., 1959.
21. KUTT, H.; WINTERS, W. & McDOWELL, F.H. Depression of parahydroxylation of diphenylhydantoin by antituberculosis chemotherapy. Neurology, Minneap., 16: 594-602 , 1966.
22. METREAU, J.M. Hepatites et isoniazide. Arch. Fr. Mal. App. Dig., 65: 252-254, 1976.
23. MOTULSKY, A.G. Pharmacogenetics. IN: Progress Med. Genet., Grune & Stratton, 3: 49-74, 1964.
24. NELSON, S.D.; METCHELL, J.R.; TEMBRELL, J.A.; SNOD-GRASS, W.R. & CORCORAN, G.B. Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. Science, 193: 901-903, 1976.
25. OTTENSOOSER, F. Cálculo do grau de mistura racial através dos grupos sanguíneos. Rev. Bras. Biol., 4: 531-537 , 1944.

26. PESSAYRE, D.; BENTATA, M.; DEGOTT, C.; NOUEL, O.; MIGUET, J.P.; RUFF, B. & BENHAMOU, J.P. Isoniazid-rifami in fulminant hepatitis. Gastroenterology, 72: 284-289 , 1977.
27. PETERS, J.H.; GORDON, G.R. & BROWN, P. The relationship between the capacities of human subjects to acetylate isoniazid, sulfanilamide and sulfamethazine. Life Sci., 4: 99-107, 1965.
28. RAMALHO, A.S. Estudo médico de polimorfismos genéticos de importância clínica no Brasil. Tese de Livre Docência. Universidade Estadual de Campinas, 1979.
29. RAMALHO, A.S.; BEIGUELMAN, B. & GARLIPP, C.R. Estimativa da frequência de acetiladores rápidos e lentos da isoniazida em descendentes de japoneses do Estado de São Paulo. Ciência e Cultura, 29: 696, 1977.
30. SUNAHARA, S.; URANO, M.; LIN, H.T.; CHEG, J.J. & JARUMILIN DA, A. Further observations on trimodality on frequency distribution curve of biologically active isoniazid blood levels and line in frequencies of alleles controlling isoniazid inactivation. Acta Tuberc. Pneumol. Scand., 43: 181-195, 1963.
31. SUNAHARA, S.; URANO, M. & OGAWA, M. Genetical and geographical studies on isoniazid inactivation. Science, 134: 1530-1531, 1961.

32. VIZNEROVÁ, A.; SLAVIKOVÁ, Z. & ELLARD, G.A.      The  
determination of the acetylator phenotype of tuberculo  
sis patientes in Czechoslovakia using sulphadiazine .  
Tubercle, 54: 67-71, 1973.