



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

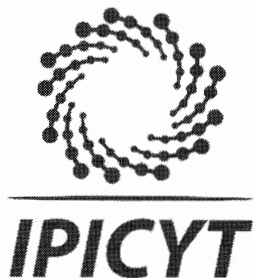
**Farmacogenética basada en la secuencia de
regiones polimórficas de los genes
involucrados en el metabolismo de isoniacida**

Tesis que presenta
Guillermo Pettet Ruiz

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis
Dr. Rubén López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Farmacogenética basada en la secuencia de regiones polimórficas de los genes involucrados en el metabolismo de isoniácida***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Guillermo Pettet Ruiz** y aprobada el **diez de julio de dos mil diecisiete** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Director de la tesis

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial



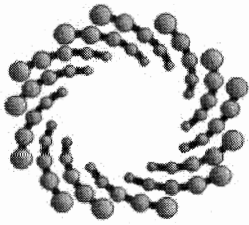
Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo de tesis Guillermo Pettet Ruiz recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 387301).

El trabajo fue financiado con fondos asignados al subproyecto “Evaluación farmacogenética y farmacocinética de antifímicos para la optimización del tratamiento de la tuberculosis latente en el paciente con diabetes mellitus 2”, aportados por el Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del estado de San Luis Potosí (clave FMSLP-2014-002-250277) para el proyecto “Red Potosina Interinstitucional de Farmacogenética y Monitorización de Fármacos”.

El responsable del protocolo de investigación clínica fue el Dr. Javier Reinoso, adscrito al Servicio de Medicina Interna del Hospital General del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en la ciudad de San Luis Potosí.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 162 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de julio del año 2017, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Presidente

IPICYT

Dr. Samuel Lara González

Secretario

IPICYT

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

Sinodal

IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Guillermo Pettet Ruiz

sobre la Tesis intitulada:

Farmacogenética basada en la secuencia de regiones polimórficas de los genes involucrados en el metabolismo de isoniacida

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 12:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de julio de 2017.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Quisiera agradecer a mis padres, Bernardo y Marcela, ya que gracias a su apoyo incondicional y paciencia he podido alcanzar esta meta.

Agradecimientos

Al Dr. Rubén López Revilla por la confianza depositada en mí y por su guía durante esta etapa de mi desarrollo profesional.

A la Bióloga Mireya Sánchez Garza ya que sin todos sus consejos y ayuda en cada paso este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Joaquín Reinoso por su entusiasmo e incansable apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Silvia Romano Moreno, la Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia y todos los compañeros de la Red Potosina Interinstitucional de Farmacogenética y Monitorización de Fármacos.

A Mariana, Víctor, Ricardo, Gloria y todos los compañeros del laboratorio por sus amistad, consejos y ayuda.

A todo el personal de LANBAMA por su gran trabajo técnico.

A CONACYT por el apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Farmacogenética y farmacogenómica	1
Tratamiento de la tuberculosis con isoniacida (INH)	2
Enzimas involucradas en el metabolismo de isoniacida (INH)	3
<i>N-acetil transferasa 2 (NAT2)</i>	3
<i>Citocromo P450 E21 (CYP2E1)</i>	5
<i>Glutación S-transferasa M1 (GSTM1)</i>	5
Justificación	5
Etapas del estudio	6
Material y métodos	7
Diseño y validación de oligonucleótidos para NAT2, CYP2E1 y GSTM1	7
Montaje y optimización de la PCR para NAT2 y CYP2E1	9
Montaje y optimización de la PCR dúplex para GSTM1 y β -globina	9
Purificación de los productos de PCR	12
Análisis de las secuencias para identificar los polimorfismos	12
Haplotipos de NAT2 y fenotipo acetilador	13
Resultados	13
Validación in silico de los oligonucleótidos diseñados	13
<i>NAT2</i>	13
<i>CYP2E1</i>	13
<i>GSTM1</i>	14
PCR para los amplicones NAT2-793 pb y CYP2E1-412 pb	14
PCR dúplex para GSTM1/ β -globina	14
Secuencias de NAT2 y CYP2E1	14
Identificación de SNPs de NAT2 y CYPE1	15
Distribución de polimorfismos de NAT2, CYP2E1 y GSTM1	21
Prevalencia de haplotipos y fenotipos acetiladores	21
Asociación de los fenotipos acetiladores con los polimorfismos de CYP2E1 y el genotipo GSTM1 nulo	21
Discusión	27
Referencias	29
Apéndices	32
1. Alelos humanos de NAT2 (Boukouvala 2016)	32
2. Pareja de oligonucleótidos para el amplicón de NAT2	39
3. Pareja de oligonucleótidos para el amplicón de CYP2E1	40
4. Pareja de oligonucleótidos para el amplicón de GSTM1	41

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de referencia de los genes de interés	8
Tabla 2. SNPs relevantes de <i>NAT2</i>	8
Tabla 3. SNPs relevantes de <i>CYP2E1</i>	8
Tabla 4. Mezclas de PCR para <i>NAT2</i> (50 μ L)	10
Tabla 5. Mezclas de PCR para <i>CYP2E1</i> (50 μ L)	10
Tabla 6. Mezclas de PCR para <i>GSTM1</i> / β -globina (25 μ L)	11
Tabla 7. Programa del termociclador	11
Tabla 8. Genotipos de <i>NAT2</i> y fenotipos acetiladores en los 76 sujetos incluidos	25

Lista de figuras

Fig. 1. Metabolismo de la isoniacida	4
Fig. 2. Ubicación de los SNPs relevantes en el amplicón NAT2-793 pb	16
Fig. 3. Ubicación de los SNPs relevantes en el amplicón de CYP2E1-412 pb	16
Fig. 4. Ubicación de los SNPs en el amplicón de GSTM1-485 pb	17
Fig. 5. Electroferograma de mezclas de PCR para NAT2	17
Fig. 6. Electroferograma de mezclas de PCR para CYP2E1	18
Fig. 7. Electroferograma de mezclas de PCR para GSTM1/ β -globina	19
Fig. 8. Concordancia de la secuencia del gen NAT2 con las secuencias de los amplicones generados con los oligonucleótidos NATF y NATR	20
Fig. 9. Ejemplo de SNPs heterocigoto y homocigoto silvestre	22
Fig. 10. Prevalencia de los SNPs de NAT2 en los 76 sujetos incluidos	23
Fig. 11. Prevalencia de los SNPs de CYP2E1 en los 76 sujetos incluidos	23
Fig. 12. Prevalencia del genotipo GSTM1 nulo en los 76 sujetos incluidos	24
Fig. 13. Prevalencia de los fenotipos acetiladores en los 76 sujetos incluidos	24
Fig. 14. Asociación de los genotipos de riesgo de NAT2, CYP2E1 y GSTM1	26

Resumen

Farmacogenética basada en la secuencia de regiones polimórficas de los genes involucrados en el metabolismo de isoniacida

La isoniacida (INH), fármaco de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis activa y la quimioprofilaxis de la tuberculosis latente, es hepatotóxica en sujetos con susceptibilidad genéticamente determinada. Para estimar el riesgo de hepatotoxicidad por INH, diversos polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo del fármaco --N-acetil transferasa 2 (*NAT2*), citocromo P450 2E1 (*CYP2E1*) y glutatión transferasa M1 (*GSTM1*)-- son identificados por métodos indirectos y costosos basados en sondas. En este trabajo desarrollamos un método de genotipificación basado en la secuenciación de las regiones polimórficas de *NAT2* y *CYP2E1* y la delección de *GSTM1* para adecuar el tratamiento con INH. Diseñamos las parejas de oligonucleótidos y optimizamos las mezclas de PCR para amplificar las regiones polimórficas relevantes de *NAT2* y *CYP2E1* y una región exónica de *GSTM1*. La secuenciación de los amplicones de *NAT2* y *CYP2E1* purificados permitió identificar los siete SNPs de *NAT2* que determinan los haplotipos y fenotipos acetiladores rápido, lento e intermedio y los dos SNPs de *CYP2E1* asociados al riesgo de hepatotoxicidad por INH; las delecciones de *GSTM1* fueron identificadas por la falla en la generación del amplicón respectivo. Los 76 sujetos incluidos en el estudio eran atendidos en la consulta externa del Hospital General del ISSSTE de la ciudad de San Luis Potosí. Los haplotipos de *NAT2* fueron de acetilador rápido en 21 sujetos (27.6%), intermedio en 41 (53.9%) y lento en 14 (18.4%); 23 sujetos (30.2%) portan los dos SNPs relevantes de *CYP2E1* en estado heterocigoto y sólo uno (1.2%) en estado homocigoto; el genotipo *GSTM1* nulo fue identificado en 36 sujetos (47.4%). Nuestro método de menor costo basado en secuenciación identifica los SNPs relevantes de *NAT2* y *CYP2E1* y las delecciones de *GSTM1* y permite determinar la prevalencia de los genotipos predisponentes a hepatotoxicidad por INH.

Palabras clave: Isoniacida; Hepatotoxicidad; Farmacogenética; Tuberculosis; Medicina personalizada.

Abstract

Pharmacogenetics based on the sequence of polymorphic regions of isoniazid metabolizing genes

Isoniazid (INH), a first line drug for treatment of active tuberculosis and chemoprophylaxis of latent tuberculosis, is hepatotoxic in genetically susceptible individuals. Several polymorphisms of the genes encoding the three enzymes involved in INH metabolism --N-acetyltransferase (*NAT2*), cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) and glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*)-- are currently identified by expensive and indirect methods based on molecular probes. In this work we developed a genotyping method based in sequencing of the relevant polymorphic regions of *NAT2* and *CYP2E1* and amplifying a *GSTM1* exon region. Oligonucleotide pairs were designed and PCR conditions were optimized to amplify the relevant polymorphic *NAT2* and *CYP2E1* regions and the *GSTM1* exon region. Sequencing of the amplicons led to the identification of the seven *NAT2* SNPs which determine the corresponding haplotypes and the fast, intermediate and slow acetylator phenotypes, and the two *CYP2E1* SNPs associated to INH hepatotoxicity risk; *GSTM1* deletions were identified by the inability to generate the corresponding amplicon. The 76 individuals included in the study attended the outpatient clinic of the ISSSTE General Hospital of San Luis Potosí City. The *NAT2* haplotypes corresponded to fast acetylator in 21 individuals (27.6%), intermediate acetylator in 41 (53.9%) and slow acetylator in 14 (18.4%); 23 individuals (30.2%) carry both relevant *CYP2E1* SNPs in heterozygous state and only one (1.2%) in homozygous state; the *GSTM1* null genotype was identified in 36 individuals (47.4%). Our inexpensive sequence-based method identifies the relevant *NAT2* and *CYP2E1* SNPs and *GSTM1* deletions and serves to determine the prevalence of genotypes predisposing to INH hepatotoxicity.

Keywords: Isoniazid; Hepatotoxicity; Pharmacogenetics; Tuberculosis; Personalized medicine.

Introducción

Numerosos factores --edad, raza, sexo, función renal y hepática, interacciones con fármacos concomitantes, etc.-- contribuyen para generar una respuesta variable a los fármacos, por lo cual algunos individuos tienen los efectos deseados mientras que en otros hay respuestas terapéuticas disminuidas, nulas o adversas.

El conocimiento de la composición genética de cada individuo puede mejorar la elección de la farmacoterapia para evitar efectos indeseables y reacciones adversas (Kalow 2006). A pesar de la creciente disponibilidad de pruebas farmacogenéticas, su uso en la práctica clínica es limitado, por lo cual es necesario difundirlas entre el personal médico (Weitzel et al. 2014).

Farmacogenética y farmacogenómica

La farmacogenética y la farmacogenómica combinan la genética y la farmacología para establecer o describir la influencia de la herencia en la respuesta a los fármacos (Johnson 2003).

La farmacogenética trata de definir la influencia que las mutaciones en ciertos genes pueden tener sobre la eficacia de un fármaco y las reacciones adversas al mismo (Tomalik-Scharte et al. 2007). El análisis de mutaciones en genes individuales ha cambiado en los últimos años del análisis de la variación y las asociaciones entre los diversos genes involucrados en el metabolismo de los fármacos para dar lugar a la farmacogenómica (Wang et al. 2011).

Los estudios de farmacogenómica se basan en la determinación de la actividad enzimática y la identificación de los marcadores correspondientes en el genoma de quienes son afectados por alguna alteración particular o un fenotipo de respuesta alterada a los fármacos, en comparación con quienes no están afectados (Sheffield and Phillimore 2009). La identificación de tales marcadores puede emplearse para mejorar la selección, dosificación y duración del tratamiento con fármacos (Wang et al. 2011).

Tratamiento de la tuberculosis con isoniacida (INH)

La tuberculosis activa es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes y letales en el mundo. En 2015 se presentaron alrededor de 10.4 millones de casos nuevos de tuberculosis activa y se registraron 1.4 millones de defunciones en todo el mundo (WHO 2016). La farmacoterapia recomendada actualmente contra la tuberculosis activa es una combinación de cuatro fármacos de primera línea --isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol-- administrada durante seis meses (Sotsuka et al. 2011).

Dos eventos pueden caracterizarse como fallas del tratamiento antituberculoso con INH: la hepatotoxicidad inducida y la falla temprana de respuesta al fármaco (i.e., dentro de las primeras ocho semanas).

A la hepatotoxicidad inducida por INH y otros fármacos contra la tuberculosis ('antifímicos') contribuyen los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, single nucleotide polymorphisms) de los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo, los receptores nucleares y las proteínas transportadoras de fármacos (Singh et al. 2014). La hepatotoxicidad por INH es el principal factor por el cual es discontinuado el tratamiento, que también se asocia al desarrollo de resistencia a los antifímicos y a la reactivación de la tuberculosis (Singla et al. 2014).

La falla temprana del tratamiento se caracteriza por un cultivo de esputo positivo tras ocho semanas de iniciado el tratamiento con INH. En casos de cultivo de esputo negativo al inicio del tratamiento, la falla terapéutica se determina por ausencia de mejoría en la radiografía de tórax tras ocho semanas de administración de INH (Azuma et al. 2012).

Evidencia creciente sugiere que el ajuste de la dosis de INH basada en la farmacogenética puede reducir significativamente la hepatotoxicidad y la ineficacia del tratamiento (Azuma et al. 2012; Kubota et al. 2007; Kinzig-Schippers et al. 2005).

La dosis estándar de INH es de 5 mg/kg de peso corporal. El régimen de dosificación puede basarse en el fenotipo acetilador de *NAT2*: a los acetiladores lentos se les administra la mitad de la dosis estándar (2.5 mg/kg) y a los acetiladores rápidos 1.5 veces la dosis estándar (7.5 mg/kg) (Azuma et al. 2012; Kubota et al. 2007).

En los acetiladores lentos tratados con el régimen basado en su fenotipo disminuye hasta 100% el desarrollo de hepatotoxicidad por INH respecto a los pacientes a quienes se administra la dosis estándar. Tanto en los pacientes tratados con la dosis estándar como en los tratados con la dosis ajustada hay mejoría tras ocho semanas, lo que implica que con la dosis ajustada se alcanzan concentraciones de INH con efecto terapéutico (Azuma et al. 2012; Kinzig-Schippers et al. 2005). En los acetiladores rápidos tratados con la dosis ajustada hay disminución significativa en la falla temprana del tratamiento y la incidencia de hepatotoxicidad por INH no es significativamente diferente de la de los que reciben la dosis estándar (Azuma et al. 2012; Kubota et al. 2007). Por otra parte, los acetiladores intermedios responden favorablemente al tratamiento con la dosis estándar (Azuma et al. 2012; Kinzig-Schippers et al. 2005).

Enzimas involucradas en el metabolismo de isoniacida (INH)

La vía principal del metabolismo de la INH (Fig. 1) es la conversión a acetilisoniacida (AcINH) por la N-acetiltransferasa 2 (NAT2), enzima que lleva a cabo el 50-90% de la transformación, mientras que el resto de la INH es transformada en hidracina (Hz) por hidrólisis. Una parte de la AcINH es hidrolizada en acetil-hidracina (AcHz), metabolizada en el hígado por la citocromo P450 oxidasa 2E1 (CYP2E1). La acción de la CYP2E1 sobre AcHz y Hz produce metabolitos tóxicos, principalmente radicales libres, que son eliminados por la glutatión-S-transferasa M1 (GSTM1). Mutaciones que disminuyen la actividad de estas enzimas dan lugar a la acumulación de metabolitos hepatotóxicos (Sotsuka et al. 2011).

N-acetil transferasa 2 (NAT2)

La enzima NAT2 --componente principal de la vía de conversión de INH a AcINH--, codificada por el gen *NAT2*, tiene varios polimorfismos comunes en las poblaciones humanas (Hein and Doll 2012). Modificaciones que disminuyen la actividad de NAT2 resultan en acumulación de precursores hepatotóxicos, como la AcHz. Las mutaciones en *NAT2* determinan tres fenotipos acetiladores: rápido, intermedio y lento (Chamorro et al. 2013). Las variantes alélicas de *NAT2* son el resultado de las combinaciones de diversos SNPs. Los individuos con dos variantes alélicas

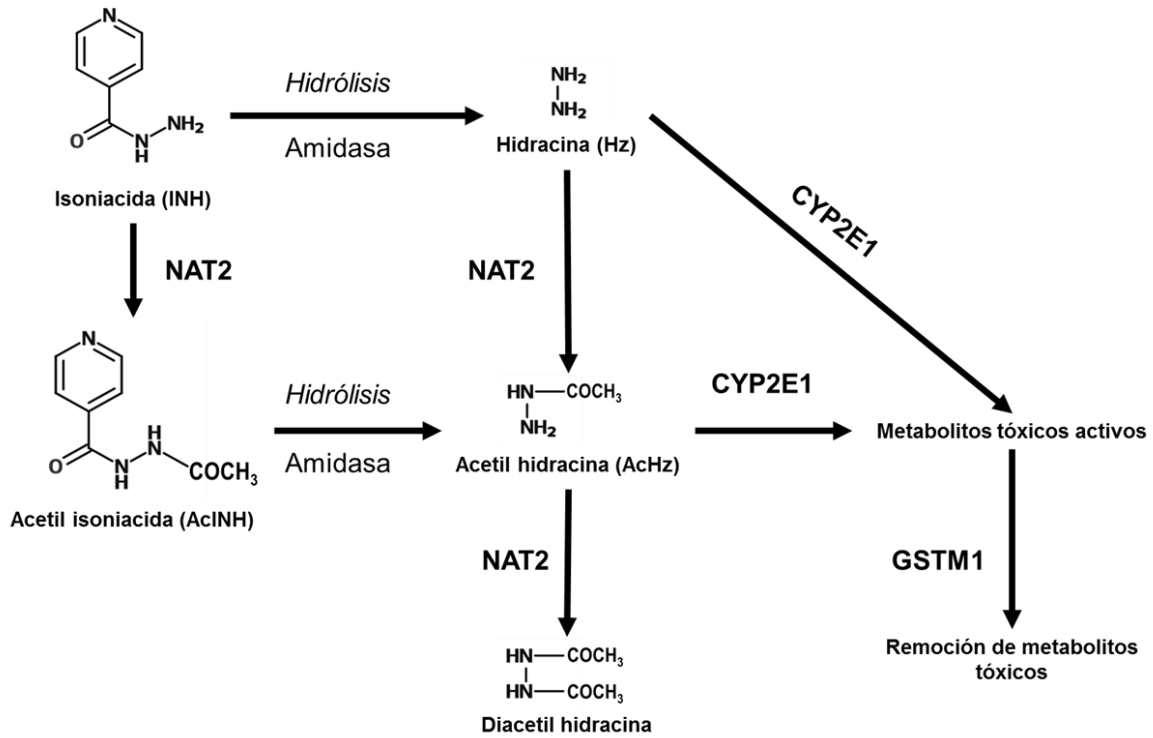


Fig. 1. Metabolismo de la isoniacida

La INH, metabolizada por NAT2 y CYP2E1, genera intermediarios tóxicos (Hz y AcHz) que son eliminados por acción de la GSTM1. La inhibición de cualquiera de las enzimas de esta ruta puede causar acumulación de metabolitos nocivos que derivan en hepatotoxicidad.

asociadas a acetilación rápida (*NAT2*4*, *NAT2*11*, *NAT2*12* y *NAT2*13*) se consideran acetiladores rápidos, mientras que los que poseen dos alelos asociados a baja actividad (*NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7* y *NAT2*14*) se consideran acetiladores lentos. Quienes portan un alelo de cada grupo se consideran acetiladores intermedios (Hein and Doll 2012). El fenotipo acetilador lento ha sido establecido como un factor de riesgo para el desarrollo de hepatotoxicidad inducida por INH (Singla et al. 2014).

Citocromo P450 E21 (*CYP2E1*)

AcHz y Hz son oxidadas en el hígado por la *CYP2E1*, que genera radicales libres capaces de dañar a los hepatocitos por aumento de procesos redox a nivel celular (Fukino et al. 2008; Muriel 2009). Algunos polimorfismos del gen *CYP2E1* predisponen a enfermedades hepáticas y cáncer (Singla et al. 2014). Mediante análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción se han identificado dos alelos de *CYP2E1*, denominados c1 y c2. Hay mayor riesgo de hepatotoxicidad inducida por fármacos asociada a disminución de la actividad enzimática en sujetos con el genotipo c1/c1 que con los genotipos c1/c2 y c2/c2 (Sheng et al. 2014).

Glutación S-transferasa M1 (*GSTM1*)

GSTM1 pertenece a la superfamilia de las glutación transferasas (GST), involucradas en el metabolismo de fase II de algunos fármacos, que tienen un papel crucial en procesos de detoxificación en el hígado. Las GST catalizan reacciones de conjugación entre el glutación y metabolitos intermediarios tóxicos, que facilitan su eliminación y reducen el riesgo de hepatotoxicidad inducida por fármacos (Liu et al. 2014). Recientemente se demostró que el genotipo homocigoto nulo debido a la delección de ambas copias del gen *GSTM1* aumenta el riesgo de hepatotoxicidad inducida por fármacos, derivada tanto de la ausencia de actividad enzimática de *GSTM1* como de la acumulación concomitante de productos tóxicos (Li et al. 2013; Tang et al. 2013).

Justificación

La hepatotoxicidad es la causa principal del abandono del tratamiento de la tuberculosis activa y de la quimioprofilaxis de la tuberculosis latente con INH.

La identificación de los SNPs de los genes involucrados en el metabolismo de INH para predecir la respuesta individual y adecuar la dosis del fármaco para prevenir la hepatotoxicidad y aumentar la adherencia al tratamiento se basa actualmente en métodos comerciales indirectos y costosos.

El desarrollo de métodos de bajo costo basados en la secuenciación de las regiones polimórficas de los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo de INH permitiría determinar su prevalencia en la población y adecuar la dosis del fármaco en cada paciente con tuberculosis activa o latente que deba ser tratado, y contribuiría al desarrollo de la farmacogenética en el estado de San Luis Potosí.

El propósito de este trabajo fue desarrollar un método de bajo costo basado en la secuenciación para determinar los polimorfismos clínicamente relevantes de los genes *NAT2* y *CYP2E1* y la presencia/ausencia del gen *GSTM1* en un grupo de adultos residentes en la ciudad de San Luis Potosí.

Etapas del estudio

El estudio se llevó a cabo en seis etapas:

1. Selección de los SNPs clínicamente relevantes de los genes *NAT2* (Hein and Doll 2012) y *CYP2E1* (Sheng et al. 2014) y de los métodos para identificarlos.
2. Diseño y validación in silico de los oligonucleótidos y optimización de las mezclas de PCR para amplificar las regiones génicas que contienen los SNPs relevantes de *NAT2* y *CYP2E1* y determinar el genotipo nulo de *GSTM1*.
3. Secuenciación de los productos de PCR ('amplicones') generados a partir de DNA purificado de la sangre de los sujetos incluidos en el estudio, e identificación de los SNPs por alineación de las secuencias de los amplicones con las de los genes de referencia respectivos.
4. Determinación de los genotipos homocigoto silvestre (*wild type*), homocigoto polimórfico y heterocigoto mediante el análisis de los cromatogramas de secuenciación de los amplicones de *NAT2* y *CYP2E1*.

5. Diagnóstico de los haplotipos y fenotipos acetiladores (rápido, lento, intermedio) a partir de los genotipos de *NAT2* y *CYP2E1* y de la delección del gen *GSTM1* en los sujetos incluidos en el estudio.
6. Determinación de la prevalencia de los genotipos de riesgo para la hepatotoxicidad por INH en los sujetos incluidos en el estudio.

El método desarrollado en este trabajo efectivamente permite identificar los polimorfismos de *NAT2* y *CYP2E1* y la delección de *GSTM1* de manera confiable y a menor costo que los métodos disponibles comercialmente. Podrá aplicarse para determinar la dosis de INH adecuada para la quimioprofilaxis de la tuberculosis latente y el tratamiento de la tuberculosis activa.

Material y métodos

Diseño y validación de oligonucleótidos para *NAT2*, *CYP2E1* y *GSTM1*

Las secuencias de los genes *NAT2* y *CYP2E1* de referencia (Tabla 1) fueron seleccionadas de la base de datos RefSeq (Pruitt et al. 2014). Las posiciones de los SNPs clínicamente relevantes del gen *NAT2* (Tabla 2) y del gen *CYP2E1* (Tabla 3) fueron identificadas en la base de datos de variaciones genéticas, dbSNP (Sherry et al. 2001).

La aplicación Primer-BLAST (Ye et al. 2012) se utilizó para el diseño de oligonucleótidos para amplificar las regiones génicas de interés. Los oligonucleótidos diseñados fueron probados con el programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT Technologies) para determinar la presencia y estabilidad de las estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros, así como la temperatura de *annealing* y contenido de GC. La especificidad de los oligonucleótidos se estableció con la herramienta BLAST (Altschul et al. 1990). De esta manera fueron seleccionadas las parejas de oligonucleótidos para *NAT2* (NATF/NATR), *CYP2E1* (CYPF/CYPR) y *GSTM1* (GSTF/GSTR); además fue incluida la pareja de oligonucleótidos PC04/GH20 para β -globina (Vossler et al. 1995) como control de amplificación en la PCR dúplex *GSTM1*/ β -globina. Los oligonucleótidos fueron adquiridos de

Tabla 1. Secuencias de referencia de los genes de interés

Gen	Acceso NCBI	Localización cromosómica	Secuencia (pb)
<i>NAT2</i>	NG_012246.1	8p22	16,969
<i>CYP2E1</i>	NG_008383.1	10q26.3	18,754
<i>GSTM1</i>	NG_009246	1p13.3	12,950

Tabla 2. SNPs relevantes de *NAT2*

Localización dentro de ORF	Acceso NCBI	Cambio de base	Cambio de residuo
191	rs1801279	G>A	R>Q
282	rs1041983	C>T	Sinónimo
341	rs1801280	T>C	I>T
481	rs1799929	C>T	Sinónimo
590	rs1799930	G>A	R>Q
803	rs1208	A>G	R>K
857	rs1799931	G>A	G>E

Tabla 3. SNPs relevantes de *CYP2E1*

Localización cromosómica	Acceso NCBI	Cambio de base
133526101	rs3813867	G>C
133526341	rs2031920	C>T

Integrated DNA Technologies y las soluciones madre de cada oligonucleótido (100 μ M) fueron disueltas con TE (Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM, pH 8.0). A partir de las soluciones madre fueron preparadas alícuotas de las soluciones de trabajo (10 μ M), que fueron almacenadas a -20 °C.

Montaje y optimización de la PCR para *NAT2* y *CYP2E1*

Con las parejas de oligonucleótidos NATF/NATR y CYPF/CYPR respectivamente fueron preparadas mezclas de PCR de 50 μ L a las que se añadieron muestras de DNA (20 ng/ μ L) purificadas de sangre completa anticoagulada con EDTA. Para determinar las condiciones de amplificación se probaron concentraciones variables de dNTPs y MgCl₂ y diversas temperaturas de annealing. Las condiciones de PCR optimizadas experimentalmente se muestran en las Tabla 4 y 5. El tamaño e integridad de los productos de PCR fue determinado por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer de boratos, corridos a 90 volts por 90 min.

Montaje y optimización de la PCR dúplex para *GSTM1* y β -globina

Se prepararon mezclas de PCR de 25 μ L empleando las parejas de oligonucleótidos GSTF/GSTR y PC04/GH20 para β -globina como control interno para asegurar la amplificabilidad del DNA. Se probaron concentraciones variables de dNTPs y MgCl₂, así como temperaturas de annealing variables con el fin de encontrar las condiciones de amplificación adecuadas. Las condiciones óptimas para la PCR establecidas experimentalmente se indican en la Tabla 6.

Para identificar la delección de *GSTM1* que da como resultado el genotipo nulo se determinó la presencia o ausencia de la banda del amplicón *GSTM1* de 485 pb junto con la presencia de la banda de amplicón de β -globina de 268 pb, separadas por electroforesis en geles de agarosa al 2% con buffer de boratos corridos a 90 V por 90 min.

Para todas las mezclas de PCR se utilizó el mismo programa de termociclado (Tabla 7).

Tabla 4. Mezclas de PCR para NAT2 (50 μ L)

Componente	μL/mezcla	Concentración final
Agua MilliQ estéril	37.5	---
Buffer PCR 10x	5.0	1x
MgCl ₂ 50 mM	2.0	2.0
dNTPs 10 mM c/u	1.0	200 μ M c/u
Oligonucleótidos NATF/NATR 10 μ M c/u	1.5	300 nM c/u
Taq Blue 1 U/ μ L	1.0	1 U
DNA genómico 20 ng/ μ L	2.0	40 ng

Tabla 5. Mezclas de PCR para CYP2E1 (50 μ L)

Componente	μL/mezcla	Concentración final
Agua MilliQ estéril	37.5	---
Buffer PCR 10x	5.0	1x
MgCl ₂ 50 mM	2.0	2.0
dNTPs 10 mM c/u	1.0	200 μ M c/u
Oligonucleótidos CYPF/CYPR 10 μ M c/u	1.5	300 nM c/u
Taq Blue 1 U/ μ L	1.0	1 U
DNA genómico 20 ng/ μ L	2.0	40 ng

Tabla 6. Mezclas de PCR para GSTM1/ β -globina (25 μ L)

Componente	μ L/mezcla	Concentración final
Agua MilliQ estéril	17.9	---
Buffer PCR 10x	2.5	1x
MgCl ₂ 50 mM	1.0	2.0
dNTPs 10 mM c/u	0.5	200 μ M c/u
Oligonucleótidos GSTF/GSTR 10 μ M c/u	0.8	300 nM c/u
Oligonucleótidos PC04/GH20 10 μ M c/u	0.8	300 nM c/u
Taq Blue 1 U/ μ L	0.5	0.5 U
DNA genómico 20 ng/ μ L	1.0	20 ng

Tabla 7. Programa del termociclador

Etapas	$^{\circ}$ C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
30 ciclos		
Desnaturalización	94	30 s
Alineación	55	30 s
Extensión	72	1 min
Extensión final	72	10 min
Conservación	25	∞

Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados por precipitación. Se transfirió el volumen restante de la reacción de PCR (44 μL) a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, luego se añadieron 4.4 μL de acetato de sodio 3 M y 132 μL de etanol absoluto grado biología molecular y se agitó con el Vórtex por 3 s. La mezcla se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min y el sobrenadante fue descartado. A la pastilla de DNA se añadieron 500 μL de etanol al 70% y se agitó con el Vórtex. La pastilla fue secada colocando el tubo destapado en un termoblock a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Para disolver el DNA precipitado se añadieron 50 μL de agua libre de nucleasas a temperatura ambiente que se mantuvo por 1 h. Las muestras para secuenciación se cuantificaron y se prepararon diluciones con 15 ng/ μL en volúmenes de 50 μL .

Los amplicones de *NAT2* se secuenciaron con los oligonucleótidos NATF y NATR. Los de *CYP2E1* solamente con el oligonucleótido CYPR. Para la secuenciación de cada muestra se entregaron al LANBAMA alícuotas de 5 μL con los oligonucleótidos respectivos con una concentración 15 μM .

Análisis de las secuencias para identificar los polimorfismos

La calidad e integridad de las secuencias obtenidas fue verificada por alineación con la secuencia de referencia respectiva utilizando el programa MultiAlin (Corpet 1988).

Las secuencias de *NAT2* obtenidas con los oligonucleótido NATF y NATR y las secuencias de *CYP2E1* obtenidas con el oligonucleótido CYPR se alinearon con las secuencias de referencia respectivas.

Los polimorfismos de *NAT2* y *CYP2E1* se identificaron mediante análisis de los cromatogramas de secuenciación, empleando el software FinchTV (Geospiza 2006). Con esta herramienta también es posible determinar si el SNP es homocigoto o heterocigoto mediante observación de la señal en la posición de cada SNP. Un solo pico en la posición de un SNP indica que el alelo silvestre o mutado es homocigoto; dos picos de intensidad similar en la posición de un SNP indican heterocigocidad.

La identificación del genotipo *GSTM1* nulo se realizó mediante observación de la banda electroforética del amplicón de 485 pb. La presencia de la banda corresponde al genotipo normal; la ausencia corresponde al genotipo nulo, es decir, deleción de *GSTM1*. Los resultados son válidos si aparece la banda de 268 pb del amplicón de β -globina (control positivo).

Haplotipos de *NAT2* y fenotipo acetilador

Los haplotipos de *NAT2* contienen SNPs característicos que ya han sido registrados (Boukouvala 2016). A partir de los haplotipos se define el fenotipo de relevancia clínica para catalogar a los sujetos como acetiladores rápidos, intermedios o lentos. Se consideran acetiladores rápidos los que portan dos alelos considerados de metabolismo rápido para INH; lentos los que portan dos alelos de metabolismo disminuido; intermedios los que portan un alelo de cada tipo. El fenotipo acetilador lento se considera como un factor de riesgo para el desarrollo de hepatotoxicidad por el tratamiento con INH.

Resultados

Validación in silico de los oligonucleótidos diseñados

Las parejas de oligonucleótidos (forward y reverse) diseñadas para amplificar las regiones polimórficas de cada gen de interés cumplieron los requisitos de validación in silico descritos a continuación.

NAT2

Las mezclas de PCR para *NAT2* generarían el amplicón esperado de 793 pb, ubicado dentro del ORF que contiene los siete SNPs clínicamente relevantes y su secuenciación permitiría identificar los SNPs relevantes, necesarios para determinar el haplotipo y el fenotipo acetilador (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

CYP2E1

Los oligonucleótidos CYPF y CYPR generarían el amplicón *CYP2E1* de 412 pb con los dos SNPs relevantes ubicados en la zona de unión del promotor al ORF. La

secuencia del amplicón permitiría identificar los polimorfismos relevantes (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

GSTM1

Los oligonucleótidos para *GSTM1* generarían el amplicón de 485 pb localizado dentro del ORF. La delección de *GSTM1* abarca casi todo el ORF, por lo que la ausencia del amplicón de 485 pb, asociada a la presencia del amplicón de β -globina de 268 pb en la misma mezcla de PCR, evidencia la delección (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

PCR para los amplicones NAT2-793 pb y CYP2E1-412 pb

Con las condiciones de PCR para *NAT2* se obtuvo la banda esperada de 793 pb, única y nítida, que no apareció en los controles sin DNA (Fig. 5).

Con las condiciones de PCR para *CYP2E1* se obtuvo la banda esperada de 412 pb, única y nítida, que no apareció en el control sin DNA (Fig. 6).

PCR dúplex para *GSTM1*/ β -globina

Con las condiciones de PCR empleadas, en la misma mezcla pudieron generarse los amplicones *GSTM1*-485 pb y β -globina-268 pb. El segundo funciona como control positivo que asegura la amplificabilidad del DNA utilizado en el ensayo.

Las muestras de todos los 76 sujetos incluidos generaron la banda nítida esperada para el amplicón de β -globina-268 pb. El genotipo de las muestras en las que apareció la banda del amplicón *GSTM1*-412 pb fue considerado como *GSTM1* silvestre y como *GSTM1* nulo el de las muestras con dicha banda ausente (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Secuencias de *NAT2* y *CYP2E1*

Las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos forward y reverse para *NAT2* y forward para *CYP2E1* empleados para reamplificar y secuenciar los amplicones purificados fueron alineadas con los genes respectivos. En todas las muestras fueron resueltas las regiones con los SNPs relevantes de *NAT2* y *CYP2E1* (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Identificación de SNPs de *NAT2* y *CYP1*

Para identificar los SNPs relevantes de cada muestra fueron analizados los cromatogramas de secuenciación mediante la búsqueda de una secuencia de 10 pb corriente arriba del SNP. La identificación se realizó con la herramienta de

13861 TGTTCCCTTT GAGAACCTTA ACATGCATTG TGGGCAAGCC ATGGAGTTGG GCTTAGAGGC
 13921 TATTTTTGAT CACATTGTAA GAAGAAACC GGGTGGGTGG TGTCTCCAGG TCAATCAACT
 13981 TCTGTACTGG GCTCTGACCA CAATCGGTTT TCAGACCACA ATGTTAGGAG GGTATTTTTA
 14041 CATCCCTCCA GTTAACAAAT ACAGCACTGG CATGGTTCAC CTTCTCCTGC AGGTGACCAT
 14101 TGACGGCAGG AATTACATTG TCGATGCTGG GTCTGGAAGC TCCTCCCAGA TGTGGCAGCC
 14161 TCTAGAATTA ATTTCTGGGA AGGATCAGCC TCAGGTGCCT TGCATTTTCT GCTTGACAGA
 14221 AGAGAGAGGA ATCTGGTACC TGGACCAAAT CAGGAGAGAG CAGTATATTA CAAACAAAGA
 14281 ATTTCTTAAT TCTCATCTCC TGCCAAAGAA GAAACACCAA AAAATATACT TATTTACGCT
 14341 TGAACCTCGA ACAATTGAAG ATTTTGAGTC TATGAATACA TACCTGCAGA CGTCTCCAAC
 14401 ATCTTCATTT ATAACCACAT CATTTTGTTT CTTGCAGACC CCAGAAGGGG TTTACTGTTT
 14461 GGTGGGCTTC ATCCTCACCT ATAGAAAATT CAATTATAAA GACAATACAG ATCTGGTCGA
 14521 GTTTAAAACT CTCACTGAGG AAGAGGTTGA AGAAGTGCTG AGAAATATAT TTAAGATTTT
 14581 CTTGGGGAGA AATCTCGTGC CCAAACCTGG TGATGCATCC CTTACTATTT AGAATAAGGA
 14641 ACAAATAAAA CCCTTGTA TGTATCACCC AACTCACTAA TTATCAACTT ATGTGCTATC

Fig. 2. Ubicación de los SNPs relevantes en el amplicón NAT2-793 pb

Las letras resaltadas en amarillo corresponden a los oligonucleótidos dentro de la secuencia de referencia de *NAT2*. Las letras resaltadas en rojo indican la posición de los SNPs clínicamente relevantes.

3661 GGGTGCCAAA AACAGAGGG AAGCAAAGGC CCCTGAAGCC TCTGCCAGAG GCCAACGCCC
 3721 CTTCTTGGTT CAGGAGAGG GCAGTGTTAG GTGCAGCACA ACCAATGACT TGCTTATGTG
 3781 GCTAATAAAT TGTCAAGAGA AAAACTGGGT TAGAATGCAA TATATAGTAT GTAGTCTCAT
 3841 TTTTGTATAA ATACAAGTAT AGAATGGCAT AACTCAAAAT CCACAAGTGA TTTGGCTGGA
 3901 TTGTAAATGA CTTTTATTTT CTTCAATTTCT CATCATATTT TCTATTATAC ATAAAGATTC
 3961 ATTGTTAATA TAAAAGTACA AAATTGCAAC CTATGAATTA AGAACTTCTA TATATTGCCA
 4021 GTTAGAAGAC AGAATGAAAA ACATTCTCTT CATTCTAACC ACACACACAA AAAAGCTCCA
 4081 CAAAATACCT ATGGACTACC TTCA TAGAAG GTGGAAGAGG GTCTGTATGA AGAAAATAAT
 4141 TAATACATGA AAGAAGAAGC TAGTCAATGT GGAGCTCTAT TGTGTCCCGG GATCAACAAA

Fig. 3. Ubicación de los SNPs relevantes en el amplicón de CYP2E1-412 pb

Las letras resaltadas en amarillo corresponden a los oligonucleótidos dentro de la secuencia de referencia de *CYP2E1*. Las letras resaltadas en rojo indican la posición de los SNPs clínicamente relevantes.

```

8701 GTGCTGGGAT TACAGATATG AGCCACTCCT CTTCTCTTT TTTCCCTCCA GTGTTCCACG
8761 TGTTCCCCCT GTGAGATGAG TAGCATGCTG ATTTTACTCC TATTCACCGA CCTTCTCTGC
8821 ATGAGGCAGG GAGTGAGGCA CAGTGGGAGA TGTATAGATG ACTGCCCCAT CCTGGAAATG
8881 AGTGCACTGA GAGGGCTGCA GGCAGAGCAG CCTGTGAGGT GTGTGTGGCA CCACCTGGGT
8941 ACCAGGCCCG GGGCCTGCC CCACTCACG GGAACCATC CCTCACCTT GCTGATCTTG
9001 TTTAGAGCA CAAATCCTAC TTTAGTACAG ATCTGGGAAT TTGAGGCATT AGTCCAACGG
9061 GCTTCTGAGC CTAGAATCTG TTTCCCTTTC CCATCAAGAA ATCTGCTTGC TCAGCTAGTT
9121 CCCATCAGCT CTGGTTCTGG TCCAGGCTTA GTGGCCTTGG AGTTATGTAA GAGGTGGTGG
9181 GAAGGGAGGG GTGGAGGAGA GCTGAGGTCT ATGGCCTATG ACATGCCAGG GTCAATCAGT
9241 TTGAGAACAG GCAGTCCTGG ATCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTGAGATCG TGTCTTGCTG

```

Fig. 4. Ubicación de los SNPs en el amplicón de GSTM1-485 pb

Las letras resaltadas en amarillo corresponden a los oligonucleótidos dentro de la secuencia de referencia de *GSTM1*.

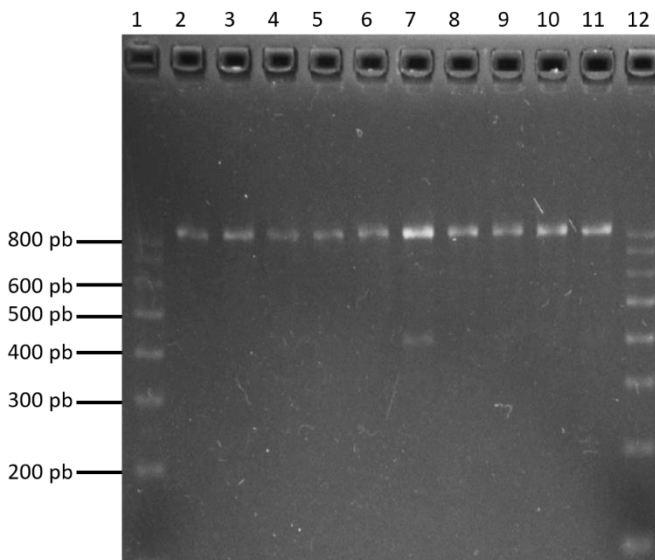


Fig. 5. Electroferograma de mezclas de PCR para NAT2

Carriles 1 y 12, escalera de 100 pb. Carriles 2-11, muestras aleatorias de DNA de los sujetos incluidos en el estudio.

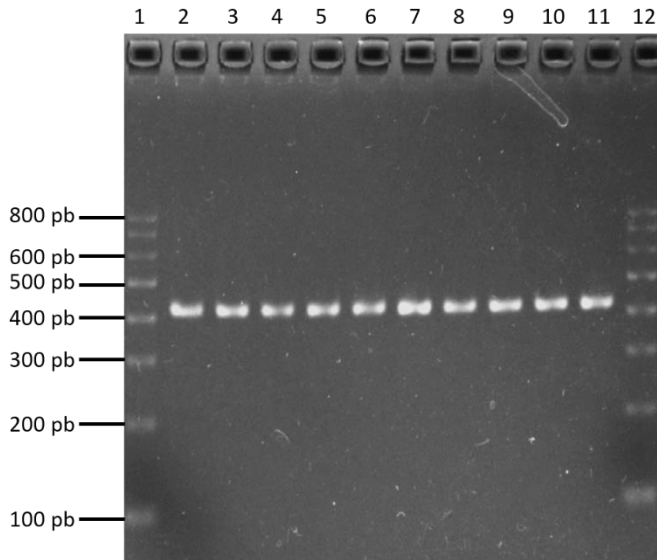


Fig. 6. Electroferograma de mezclas de PCR para CYP2E1

Carriles 1 y 12, escalera de 100 pb. Carriles 2-11, muestras aleatorias de DNA de los sujetos incluidos en el estudio.

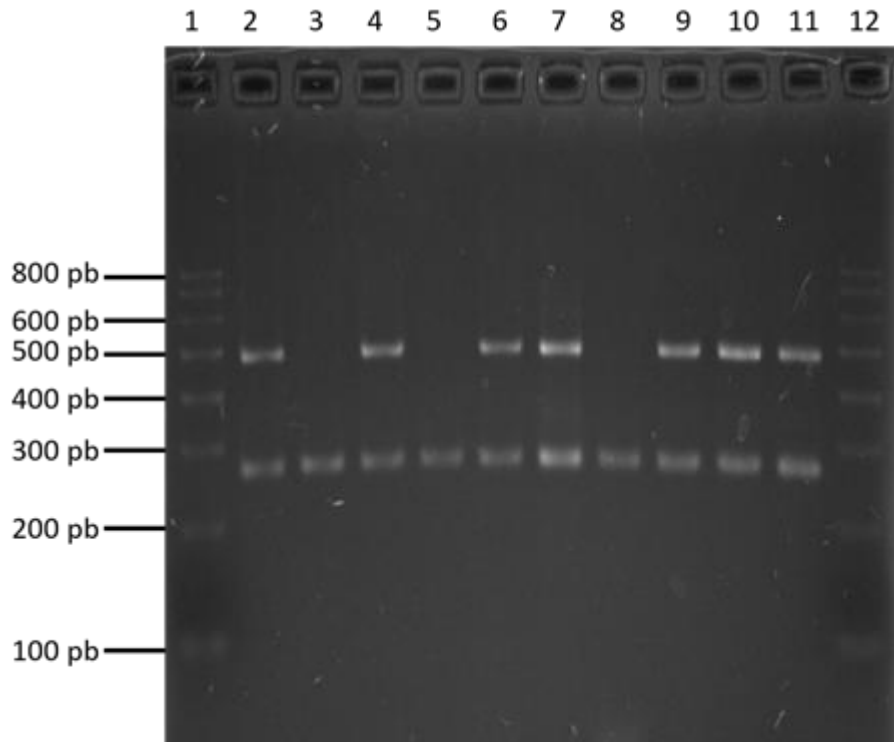


Fig. 7. Electroferograma de mezclas de PCR para GSTM1/ β -globina

Carriles 1 y 12, escalera de 100 pb. Carriles 2-11, muestras aleatorias de DNA de los sujetos incluidos en el estudio. El amplicón de β -globina de 268 pb (control interno) apareció en todas las muestras analizadas. Las muestras de los carriles 3, 5 y 8 en las que no apareció el amplicón GSTM1-485 fueron identificadas con el genotipo *GSTM1* nulo.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
REFERENCIA  T A R C A T G C A T T G T G G G C A R G C C A T G G A G T T G G G C T T A G A G G C T A T T T T T G A T C A C A T T G T A G A G A R A A C C G G G G T G G G T G T C T C C A G G T C A A T C A A C T T C T G T A C T G G G C T C T A C C A R T C G
NAT2-R      T T A R C A T G C A T T G T G G G C A R G C C A T G G A G T T G G G C T T A G A G G C T A T T T T T G A T C A C A T T G T A G A G A R A A C C G G G G T G G G T G T C T C C A G G T C A A T C A A C T T C T G T A C T G G G C T C T A C C A R T C G
NAT2-F      C T C G T T A C T C T C C - A G G C - A T T T T T G A T C A C A T T G T A G A G A R A A C C G G G G T G G G T G T C C C A G G T C A A T C A A C T T C T G T A C T G G G C T C T A C C A R T C G
Consensus  ..t.aacatgcattgtgggcaagccatggaGTTgggCTAgAGGCATTTTGTATCACATTGTAGAGARAAACCGGGGTGGGTGGTGTCCAGGTCAACTCACTCTGTACTGGGCTTGAACCAATCG
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
REFERENCIA  G T T T T C A G A C C A C A A T G T T A G G A G G G T A T T T T A C A T C C C T C C A G T T A R C A A T A C A G A C T G G C A T G G T T C A C C T T C C T C G A G G T G A C C A T T A R C G G C A G A A T T A C A T T G T C G A T G T G G G T C T G G
NAT2-R      G T T T T C A G A C C A C A A T G T T A G G A G G G T A T T T T A C A T C C C T C C A G T T A R C A A T A C A G A C T G G C A T G G T T C A C C T T C C T C G A G G T G A C C A T T A R C G G C A G A A T T A C A T T G T C G A T G T G G G T C T G G
NAT2-F      G T T T T C A G A C C A C A A T G T T A G G A G G G T A T T T T A C A T C C C T C C A G T T A R C A A T A C A G A C T G G C A T G G T T C A C C T T C C T C G A G G T G A C C A T T A R C G G C A G A A T T A C A T T G T C G A T G T G G G T C T G G
Consensus  G T T T T C A G A C C A C A A T G T T A G G A G G G T A T T T T A C A T C C C T C C A G T T A R C A A T A C A G A C T G G C A T G G T T C A C C T T C C T C G A G G T G A C C A T T A R C G G C A G A A T T A C A T T G T C G A T G T G G G T C T G G
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
REFERENCIA  A R G C T C C C C C A G A T G T G G C A G C C T A G A A T T A A T T C T G G G A G G A T C A G C C T A G G T G C C T G C A T T T C T G C T T G A R A G A G A G A G A A T C T G G T A C C T G G A C A A A T C A G A G A G A G C A G T A T
NAT2-R      A R G C T C C C C C A G A T G T G G C A G C C T A G A A T T A A T T C T G G G A G G A T C A G C C T A G G T G C C T G C A T T T T C T G C T T G A R A G A G A G A G A A T C T G G T A C C T G G A C A A A T C A G A G A G A G C A G T A T
NAT2-F      A R G C T C C C C C A G A T G T G G C A G C C T A G A A T T A A T T C T G G G A G G A T C A G C C T A G G T G C C T G C A T T T T C T G C T T G A R A G A G A G A G A A T C T G G T A C C T G G A C A A A T C A G A G A G A G C A G T A T
Consensus  A R G C T C C C C C A G A T G T G G C A G C C T A G A A T T A A T T C T G G G A G G A T C A G C C T A G G T G C C T G C A T T T T C T G C T T G A R A G A G A G A G A A T C T G G T A C C T G G A C A A A T C A G A G A G A G C A G T A T
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
REFERENCIA  A T T A C A A C A A G A A T T T C T A A T T C T A T C T C C T G C C A A G A G A R A C C A A A A A A T A C T A T T T A C G C T T G A C C T C G A R C A A T T G A G A T T T T G A G T A T A T A T A C A C C T G C A G A C G T C T C
NAT2-R      A T T A C A A C A A G A A T T T C T A A T T C T A T C T C C T G C C A A G A G A R A C C A A A A A A T A C T A T T T A C G C T T G A C C T C G A R C A A T T G A G A T T T T G A G T A T A T A T A C A C C T G C A G A C G T C T C
NAT2-F      A T T A C A A C A A G A A T T T C T A A T T C T A T C T C C T G C C A A G A G A R A C C A A A A A A T A C T A T T T A C G C T T G A C C T C G A R C A A T T G A G A T T T T G A G T A T A T A T A C A C C T G C A G A C G T C T C
Consensus  A T T A C A A C A A G A A T T T C T A A T T C T A T C T C C T G C C A A G A G A R A C C A A A A A A T A C T A T T T A C G C T T G A C C T C G A R C A A T T G A G A T T T T G A G T A T A T A T A C A C C T G C A G A C G T C T C
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
REFERENCIA  C A R C A T C T C A T T A T A C C A C A T C A T T T G T T C T T G C A G A C C C A G A G G G G T T A C T G T T G G T G G G C T C A T C C T C A C C A T A G A A A A T C A A T T A T A A G A C A A T A C A G A T C T G G T C G A G T T A A
NAT2-R      C A R C A T C T C A T T A T A C C A C A T C A T T T G T T C T T G C A G A C C C A G A G G G G T T A C T G T T G G T G G G C T C A T C C T C A C C A T A G A A A A T C A A T T A T A A G A C A A T A C A G A T C T G G T C G A G T T A A
NAT2-F      C A R C A T C T C A T T A T A C C A C A T C A T T T G T T C T T G C A G A C C C A G A G G G G T T A C T G T T G G T G G G C T C A T C C T C A C C A T A G A A A A T C A A T T A T A A G A C A A T A C A G A T C T G G T C G A G T T A A
Consensus  C A R C A T C T C A T T A T A C C A C A T C A T T T G T T C T T G C A G A C C C A G A G G G G T T A C T G T T G G T G G G C T C A T C C T C A C C A T A G A A A A T C A A T T A T A A G A C A A T A C A G A T C T G G T C G A G T T A A
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
REFERENCIA  A R C T C T C A C T G A G G A G A G G T T G A G A G T G C T G A A A A T A T T T A G A T T T C C T T G G G G A G A A T C T G T G C C C A A R C C T G G T G A T G G A T C C C T T A C T A T T T T A G A T A A G G A R C A A A A T A A A C C T T G
NAT2-R      A R C T C T C A C T G A G G A G A G G T T G A G A G T G C T G A A A A T A T T T A G A T T T C C T T G G G G A G A A T C T G T G C C C A A R C C T G G T G A T G G A C C C T T A C T T G A G T G A T T G G C T T
NAT2-F      A R C T C T C A C T G A G G A G A G G T T G A G A G T G C T G A A A A T A T T T A G A T T T C C T T G G G G A G A A T C T G T G C C C A A R C C T G G T G A T G G A T C C C T T A C T A T T T T A G A T A A G G A R C A A A A T A A A C C T T G
Consensus  A R C T C T C A C T G A G G A G A G G T T G A G A G T G C T G A A A A T A T T T A G A T T T C C T T G G G G A G A A T C T G T G C C C A A R C C T G G T G A T G G A T C C C T T A C T A T T T T A G A T A A G G A R C A A A A T A A A C C T T G
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781    790    796
|-----|-----|-----|
REFERENCIA  T G T A T G - T A T C A C C C A
NAT2-R      T G T A T G T A T C A C C C A
NAT2-F      T G T A T G T A T C A C C C A
Consensus  Tgtatg.tatcaccca

```

Fig. 8. Concordancia de la secuencia del gen NAT2 con las secuencias de los amplicones generados con los oligonucleótidos NATF y NATR
 (Referencia) Secuencia del gen NAT2 de referencia. (NAT2-R) Secuencia del amplicón generado con el iniciador NAT2R a partir de una muestra de sangre. (NAT2-F) Secuencia del amplicón de generado con el iniciador NAT2F a partir de la misma muestra. (Consensus) Secuencia consenso derivada de las de los dos amplicones generados a partir de la misma muestra. Nótese la concordancia (indicada con caracteres rojos) en casi la totalidad de las secuencias.

búsqueda del programa FinchTV. Cuando se encontró un SNP se identificó además si era heterocigoto u homocigoto (Fig. 9).

Distribución de polimorfismos de *NAT2*, *CYP2E1* y *GSTM1*

El análisis de las secuencias de los amplicones de *NAT2* y *CYP2E1*, sumado a la generación del amplicón de *GSTM1* con las muestras de los 76 sujetos incluidos en el estudio permitió determinar la prevalencia de los haplotipos y fenotipos acetiladores (Fig. 10), así como de los SNPs de *CYP2E1* (Fig. 11) y del genotipo *GSTM1* nulo (Fig. 12).

Prevalencia de haplotipos y fenotipos acetiladores

Con los SNPs identificados en cada muestra fue posible asignar el fenotipo acetilador a cada sujeto mediante la búsqueda de los haplotipos correspondiente en la tabla de alelos del gen *NAT2* humano (Boukouvala 2016). Encontramos fenotipos de *NAT2* acetiladores intermedios y lentos en una proporción elevada de los sujetos analizados, lo que les confiere mayor riesgo de reacciones adversas al tratamiento con INH (Tabla 8, Fig. 13).

Asociación de los fenotipos acetiladores con los polimorfismos de *CYP2E1* y el genotipo *GSTM1* nulo

Concomitantemente con el fenotipo acetilador de riesgo (intermedio o lento) algunos sujetos con polimorfismos en *CYP2E1* y genotipo *GSTM1* nulo podrían tener mayor riesgo de hepatotoxicidad por INH (Fig. 14).

En el 48.7% de los sujetos incluidos en el estudio se encontró un fenotipo acetilador de riesgo (intermedio o lento) asociado a genotipos de *CYP2E1* o *GSTM1* alterados. Sólo el 3.9% de los sujetos no mostraron alteraciones en los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo de INH.

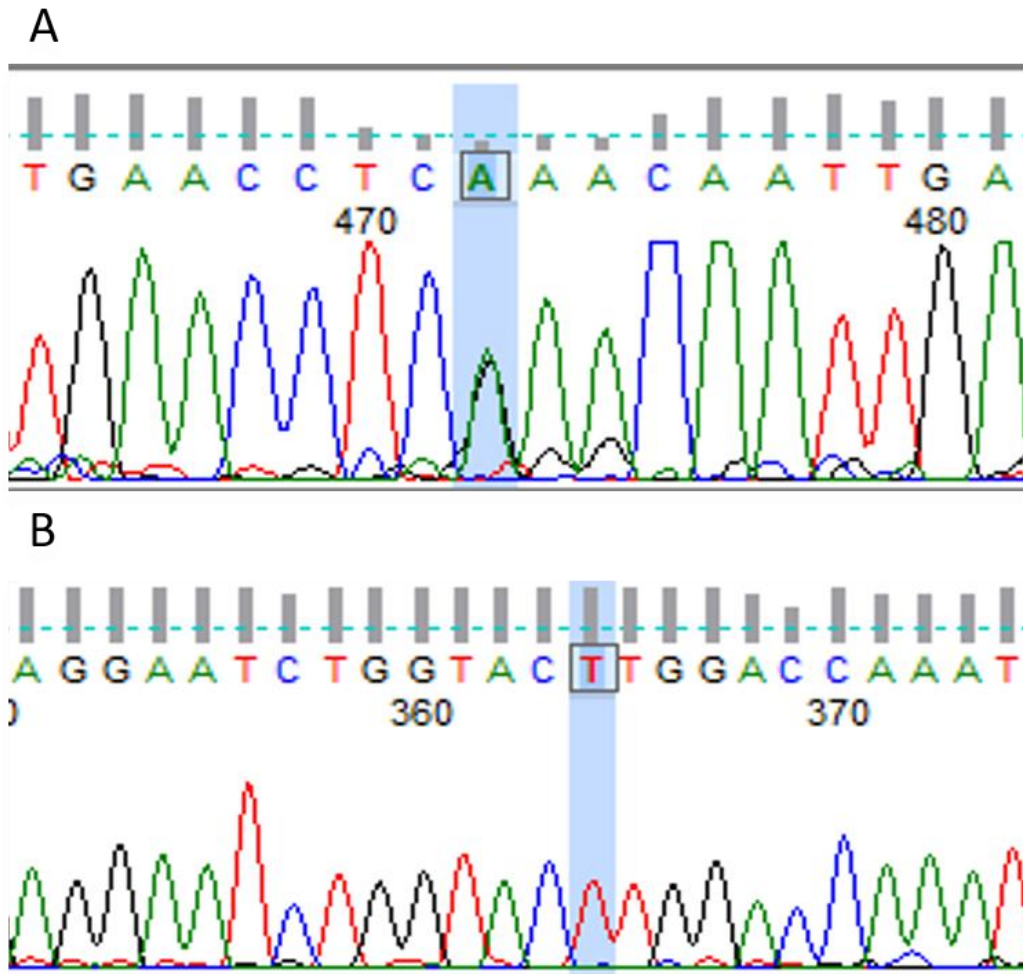


Fig. 9. Ejemplo de SNPs heterocigoto y homocigoto silvestre

(A) La presencia de dos picos de intensidad similar en una posición polimórfica indica que el sujeto es heterocigoto para el SNP de interés. (B) La presencia de un solo pico indica que el sujeto es homocigoto silvestre para el polimorfismo.

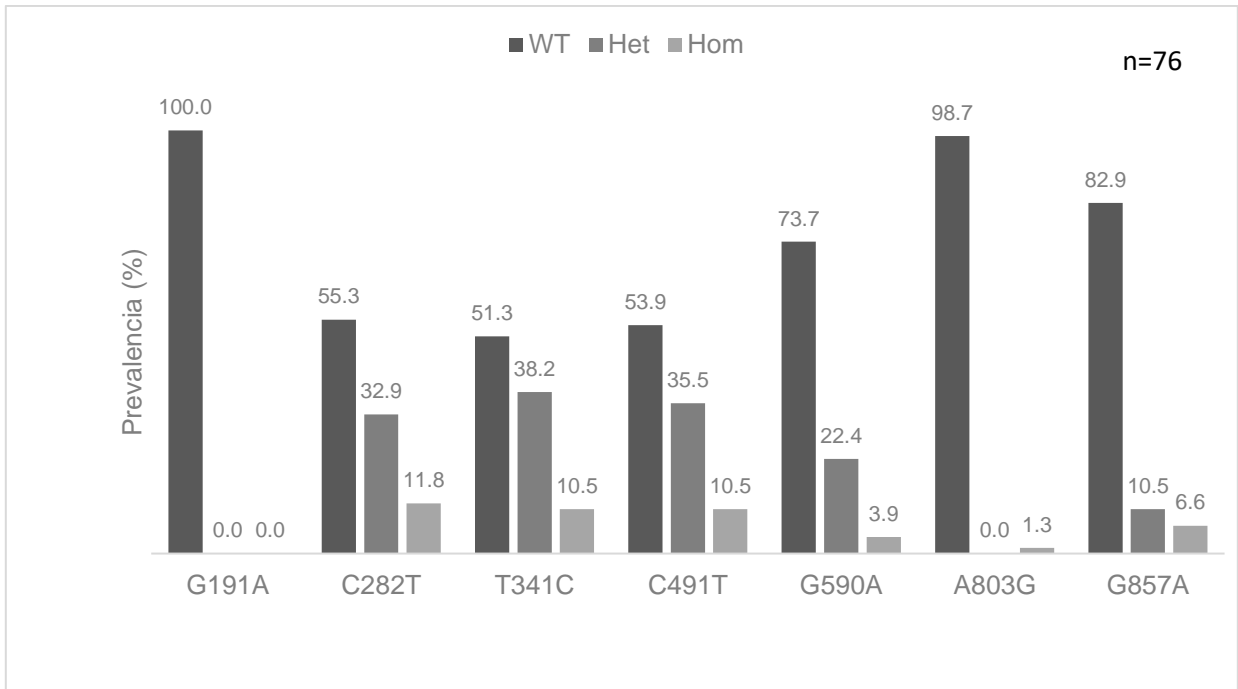


Fig. 10. Prevalencia de los SNPs de *NAT2* en los 76 sujetos incluidos
 WT, wild type. Het, SNP heterocigoto. Hom, SNP homocigoto.

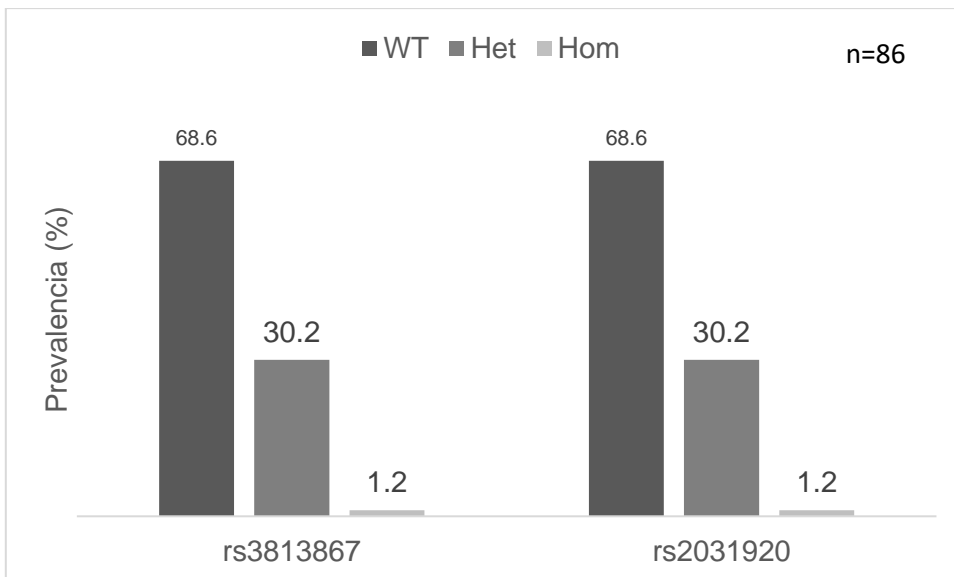


Fig. 11. Prevalencia de los SNPs de *CYP2E1* en los 76 sujetos incluidos
 WT, wild type. Het, SNP heterocigoto. Hom, SNP homocigoto.

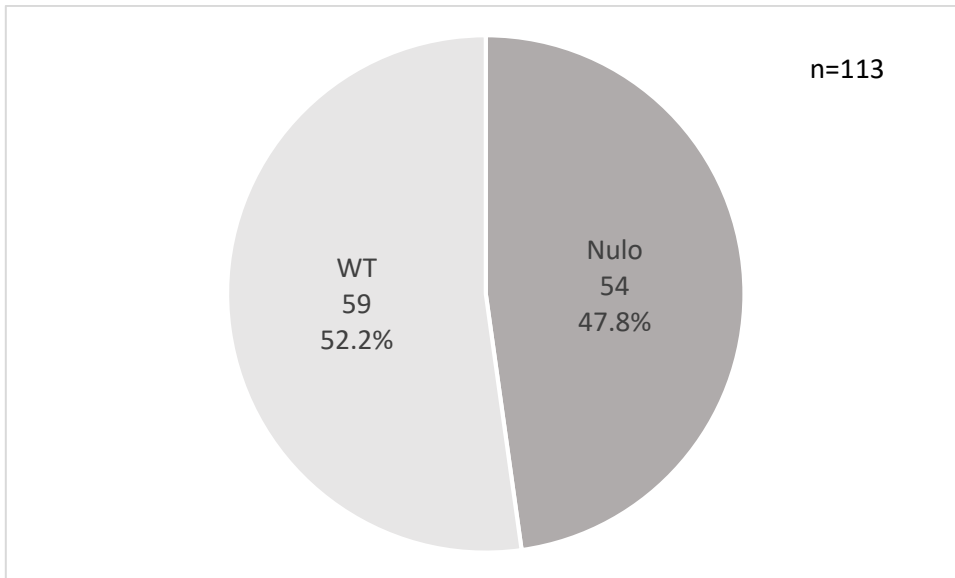


Fig. 12. Prevalencia del genotipo *GSTM1* nulo en los 76 sujetos incluidos

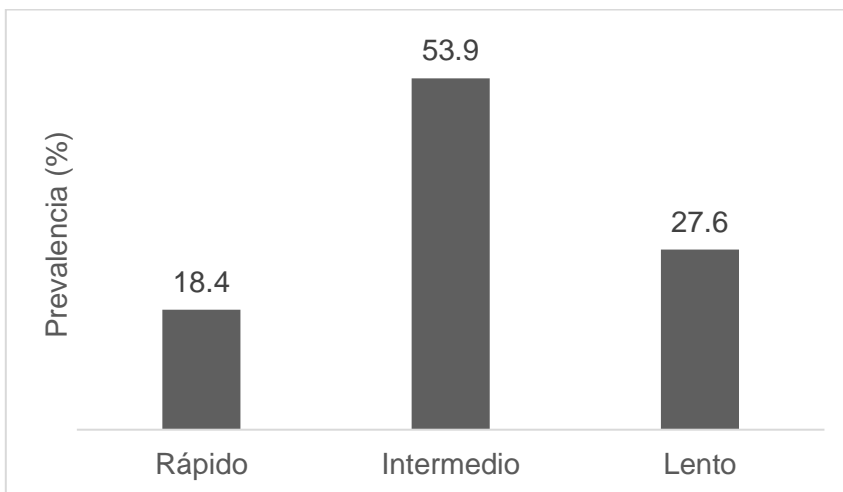


Fig. 13. Prevalencia de los fenotipos acetiladores en los 76 sujetos incluidos

Tabla 8. Genotipos de NAT2 y fenotipos acetiladores en los 76 sujetos incluidos

Genotipo		Fenotipo acetilador		
Nombre	n	Grado	Subtotal	%
5A/4	19	Intermedio	41	53.9
6A/4	11			
7G/4	4			
7A/4	2			
5D/4	2			
6I/13A	1			
5V/4	1			
5G/12A	1			
5A/5A	8	Lento	21	27.6
5A/6A	5			
7G/7G	4			
6A/6A	3			
5V/7B	1			
4/4	13	Rápido	14	18.4
13A/4	1			
Total			76	100.0

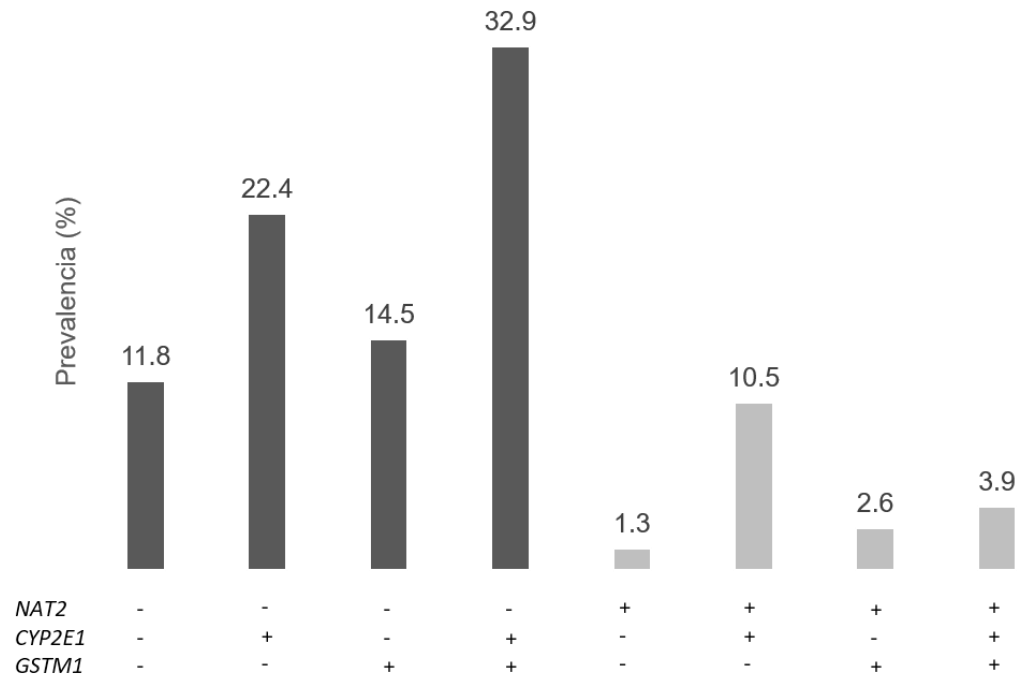


Fig. 14. Asociación de los genotipos de riesgo de NAT2, CYP2E1 y GSTM1
 -, Genotipo de riesgo. +, Genotipo silvestre.

Discusión

Con el método de bajo costo basado en la secuencia nucleotídica que desarrollamos para identificar polimorfismos cumplimos el objetivo de este trabajo y pudimos determinar la prevalencia de los genotipos de riesgo de hepatotoxicidad por INH en los 76 sujetos incluidos en el estudio. Por otra parte, este es el primer estudio de farmacogenética basado en la secuencia nucleotídica de los genes que codifican las enzimas del metabolismo de INH en San Luis Potosí y contribuye a establecer la medicina personalizada en el estado.

Los kits comerciales para el diagnóstico de polimorfismos tienen un costo elevado y requieren operadores calificados para obtener resultados confiables, aunque se basan en evidencias indirectas y no en la evidencia directa y más rigurosa que es la secuencia nucleotídica de los genes de interés (Lee et al. 2002). En contraste, nuestro método permite identificar no sólo los siete polimorfismos reconocidos como relevantes del gen *NAT2* (Hein and Doll 2012), sino además otros SNPs sin costo adicional. La integración de las pruebas para identificar los SNPs relevantes del gen *CYP2E1* y la delección del gen *GSTM1* permite evaluar mejor la capacidad individual para metabolizar INH y por lo tanto ajustar la dosis y reducir los efectos adversos.

Aunque nuestro método produce resultados confiables en tiempos aceptables, la identificación de los SNPs y haplotipos de *NAT2* y *CYP2E1* es un proceso laborioso que requiere conocimientos avanzados de farmacogenética y bioinformática. Esta situación determina que el volumen de muestras manejable actualmente sea relativamente bajo e implica que el método debería automatizarse para acelerar el análisis que permita aumentar el volumen de muestras. Además es necesario llevar a cabo una campaña educativa para que el personal médico conozca y aplique la farmacogenética para beneficio de los pacientes.

La implementación de programas de monitorización de fármacos basados en farmacogenética es un campo en desarrollo necesario para la población general, pues hay numerosos fármacos con márgenes estrechos de seguridad cuyo metabolismo está ligado a variantes genéticas individuales (Drew 2016).

El desarrollo de métodos accesibles y baratos para el diagnóstico farmacogenético permitirá reducir su costo para ponerlos al alcance de porciones cada vez mayores de la población que los requiere.

Para adecuar los regímenes terapéuticos ya se está aplicando la farmacocinética en diversas clínicas y hospitales del país (Medellin-Garibay et al. 2015). Los métodos farmacogenéticos deben complementar a la farmacocinética para anticipar la eficacia de los fármacos y prevenir el riesgo de reacciones adversas.

La genotipificación para la detección de los polimorfismos de los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo de INH permitirá identificar el riesgo de hepatotoxicidad con el régimen de dosificación estándar y hacer los ajustes posológicos necesarios para disminuir las reacciones adversas, mejorar la eficacia y evitar el abandono del tratamiento.

Referencias

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403
- Boukouvala S (2016) Human NAT2 Alleles
http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm 14-12-2016
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16:10881
- Chamorro JG, Castagnino JP, Musella RM, Nogueras M, Aranda FM, Frías A, Visca M, Aidar O, Perés S, de Larrañaga GF (2013) Sex, ethnicity, and slow acetylator profile are the major causes of hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28:323
- Drew L (2016) Pharmacogenetics: The right drug for you. *Nature* 537:S60
- Fukino K, Sasaki Y, Hirai S, Nakamura T, Hashimoto M, Yamagishi F, Ueno K (2008) Effects of N-acetyltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 and Glutathione-S-transferase (GST) genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients. *J Toxicol Sci* 33:187
- Geospiza I (2006) FinchTV <http://www.geospiza.com> 01-04-2016
- Hein DW, Doll MA (2012) Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenomics* 13:31
- Johnson JA (2003) Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends Genet* 19:660
- Kalow W (2006) Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *Pharmacogenomics J* 6:162
- Lee SY, Lee KA, Ki CS, Kwon OJ, Kim HJ, Chung MP, Suh GY, Kim JW (2002) Complete sequencing of a genetic polymorphism in NAT2 in the Korean population. *Clin Chem* 48:775
- Li C, Long J, Hu X, Zhou Y (2013) GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: an updated meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:859

- Liu F, Jiao AX, Wu XR, Zhao W, Yin QQ, Qi H, Jiao WW, Xiao J, Sun L, Shen C, Tian JL, Shen D, Jacqz-Aigrain E, Shen AD (2014) Impact of glutathione S-transferase M1 and T1 on anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese pediatric patients. *PLoS One* 9:e115410
- Medellin-Garibay SE, Cortez-Espinosa N, Milan-Segovia RC, Magana-Aquino M, Vargas-Morales JM, Gonzalez-Amaro R, Portales-Perez DP, Romano-Moreno S (2015) Clinical Pharmacokinetics of Rifampin in Patients with Tuberculosis and Type 2 Diabetes Mellitus: Association with Biochemical and Immunological Parameters. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7707
- Muriel P (2009) Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int* 3:526
- Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O, Farrell CM, Hart J, Landrum MJ, McGarvey KM, Murphy MR, O'Leary NA, Pujar S, Rajput B, Rangwala SH, Riddick LD, Shkeda A, Sun H, Tamez P, Tully RE, Wallin C, Webb D, Weber J, Wu W, DiCuccio M, Kitts P, Maglott DR, Murphy TD, Ostell JM (2014) RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res* 42:D756
- Sheffield LJ, Phillimore HE (2009) Clinical use of pharmacogenomic tests in 2009. *Clin Biochem Rev* 30:55
- Sheng YJ, Wu G, He HY, Chen W, Zou YS, Li Q, Zhong L, Huang YM, Deng CL (2014) The association between CYP2E1 polymorphisms and hepatotoxicity due to anti-tuberculosis drugs: a meta-analysis. *Infect Genet Evol* 24:34
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29:308
- Singh M, Gupta VH, Amarapurkar DN, Joshi JM, Baijal R, Ramegowda PH, Amarapurkar AD, Wangikar PP (2014) Association of genetic variants with anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity: A high resolution melting analysis. *Infection, Genetics and Evolution* 23:42
- Singla N, Gupta D, Birbian N, Singh J (2014) Association of NAT2, GST and CYP2E1 polymorphisms and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Tuberculosis* 94:293

- Sotsuka T, Sasaki Y, Hirai S, Yamagishi F, Ueno K (2011) Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients. *In Vivo* 25:803
- Tang S, Lv X, Zhang Y, Wu S, Yang Z, Xia Y, Tu D, Deng P, Ma Y, Chen D, Zhan S (2013) Cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms/haplotypes and anti-tuberculosis drug-induced hepatitis in a Chinese cohort. *PLoS One* 8:e57526
- Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner J (2007) The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *The Pharmacogenomics Journal* 8:4
- Vossler JL, Forbes BA, Adelson MD (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus from urine. *J Med Virol* 45:354
- Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM (2011) Genomics and drug response. *N Engl J Med* 364:1144
- Weitzel KW, Elsey AR, Langae TY, Burkley B, Nessler DR, Obeng AO, Staley BJ, Dong HJ, Allan RW, Liu JF, Cooper-Dehoff RM, Anderson RD, Conlon M, Clare-Salzler MJ, Nelson DR, Johnson JA (2014) Clinical pharmacogenetics implementation: approaches, successes, and challenges. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 166C:56
- WHO (2016) Global tuberculosis report <http://www.who.int/gho/tb/en/> 11-12-2016
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134

Apéndices

1. Alelos humanos de NAT2 (Boukouvala 2016)

Alelo de NAT2, haplotipo	Cambio de nucleótido (identificador)	Fenotipo acetilador
NAT2*4	Alelo de referencia	Rápido
NAT2*5A	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929)	Lento
NAT2*5B	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
NAT2*5C	341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208)	Lento
NAT2*5D	341T>C (rs1801280)	Lento
NAT2*5E	341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930)	Lento
NAT2*5F	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 759C>T (rs56011192) 803A>G (rs1208)	Lento
NAT2*5G	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
NAT2*5H	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) Δ^{859}	Lento
NAT2*5I	341T>C (rs1801280) 411A>T (rs4986997) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
NAT2*5J	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930)	Lento
NAT2*5K	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280)	Lento
NAT2*5KA	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 857G>A (rs1799931)	Lento
NAT2*5L	70T>A (rs45477599) 341T>C (rs1801280)	Lento

Alelo de NAT2, haplotipo	Cambio de nucleótido (identificador)	Fenotipo acetilador
	481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	
<i>NAT2*5M</i>	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) 838G>A (rs56393504)	Lento
<i>NAT2*5N</i>	341T>C (rs1801280) 472A>C (rs139351995) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5O</i>	203G>A (rs72466458) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5P</i>	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 578C>T (rs79050330) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5Q</i>	341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5R</i>	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5S</i>	341T>C (rs1801280) 857G>A (rs1799931)	Lento
<i>NAT2*5T</i>	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5TA</i>	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208) 857G>A (rs1799931)	Lento
<i>NAT2*5U</i>	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5V</i>	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929)	Lento

Alelo de NAT2, haplotipo	Cambio de nucleótido (identificador)	Fenotipo acetilador
<i>NAT2*5VA</i>	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 857G>A (rs1799931)	Lento
<i>NAT2*5W</i>	341T>C (rs1801280) 354T>C (rs146405047) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5X</i>	341T>C (rs1801280) 403C>G (rs12720065) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5Y</i>	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 622T>C (rs56387565) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*5Z</i>	191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929)	Lento
<i>NAT2*6A</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6B</i>	590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6C</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*6D</i>	111T>C (rs72554615) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6E</i>	481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6F</i>	590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*6G</i>	282C>T (rs1041983) 518A>G 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6H</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 766A>G (rs55700793)	Lento
<i>NAT2*6I</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 838G>A (rs56393504) 857G>A (rs1799931)	Lento

Alelo de NAT2, haplotipo	Cambio de nucleótido (identificador)	Fenotipo acetilador
<i>NAT2*6J</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931)	Lento
<i>NAT2*6K</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 638C>T (rs138707146)	Lento
<i>NAT2*6L</i>	282C>T (rs1041983) 345C>T (rs45532639) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6M</i>	152G>T (rs72466457) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6N</i>	282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6O</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 838G>A (rs56393504)	Lento
<i>NAT2*6P</i>	403C>G (rs12720065) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6Q</i>	282C>T (rs1041983) 308C>T 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*6R</i>	282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*6S</i>	590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931)	Lento
<i>NAT2*6T</i>	481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931)	Lento
<i>NAT2*6U</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 579G>T (rs144176822)	Lento
<i>NAT2*6V</i>	403C>G (rs12720065) 590G>A (rs1799930) 838G>A (rs56393504)	Lento
<i>NAT2*7A</i>	857G>A (rs1799931)	Lento; sustrato-dependiente?
<i>NAT2*7B</i>	282C>T (rs1041983) 857G>A (rs1799931)	Lento; sustrato-dependiente?

Alelo de NAT2, haplotipo	Cambio de nucleótido (identificador)	Fenotipo acetilador
<i>NAT2*7C</i>	282C>T (rs1041983) 803A>G (rs1208) 857G>A (rs1799931)	Lento; sustrato-dependiente?
<i>NAT2*7D</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 857G>A (rs1799931)	Lento; sustrato-dependiente?
<i>NAT2*7E</i>	282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 857G>A (rs1799931)	Lento; sustrato-dependiente?
<i>NAT2*7F</i>	282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) 857G>A (rs1799931)	Lento; sustrato-dependiente?
<i>NAT2*7G</i>	226T>G 282C>T (rs1041983) 857G>A (rs1799931)	Lento; sustrato-dependiente?
<i>NAT2*10</i>	499G>A (rs72554617)	Lento; sustrato-dependiente?
<i>NAT2*11A</i>	481C>T (rs1799929)	Rápido
<i>NAT2*11B</i>	481C>T (rs1799929) Δ^{859}	Rápido
<i>NAT2*12A</i>	803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12B</i>	282C>T (rs1041983) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12C</i>	481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12D</i>	364G>A (rs4986996) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12E</i>	282C>T (rs1041983) 578C>T (rs79050330) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12F</i>	622T>C (rs56387565) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12G</i>	609G>T (rs45618543) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12H</i>	403C>G (rs12720065) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12I</i>	228C>T (rs72466459) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12J</i>	29T>C (rs72466456) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12K</i>	472A>C (rs139351995) 803A>G (rs1208)	Rápido

Alelo de NAT2, haplotipo	Cambio de nucleótido (identificador)	Fenotipo acetilador
<i>NAT2*12L</i>	665T>G 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12M</i>	282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12N</i>	121A>T (rs149283608) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12</i>	29T>C (rs72466456) 609G>T (rs45618543) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*12P</i>	472A>C (rs139351995) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Rápido
<i>NAT2*13A</i>	282C>T (rs1041983)	Rápido
<i>NAT2*13B</i>	282C>T (rs1041983) 578C>T (rs79050330)	Rápido
<i>NAT2*13C</i>	282C>T (rs1041983) 665T>G	Rápido
<i>NAT2*13D</i>	282C>T (rs1041983) 766A>G (rs55700793)	Rápido
<i>NAT2*13E</i>	282C>T (rs1041983) 641C>T	Rápido
<i>NAT2*13F</i>	282C>T (rs1041983) 838G>A (rs56393504)	Rápido
<i>NAT2*13G</i>	282C>T (rs1041983) 472A>C (rs139351995)	Rápido
<i>NAT2*14A</i>	191G>A (rs1801279)	Lento
<i>NAT2*14B</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983)	Lento
<i>NAT2*14C</i>	191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*14D</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930)	Lento
<i>NAT2*14E</i>	191G>A (rs1801279) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*14F</i>	191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*14G</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 803A>G (rs1208)	Lento

Alelo de NAT2, haplotipo	Cambio de nucleótido (identificador)	Fenotipo acetilador
<i>NAT2*14H</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 683C>T (rs45518335)	Lento
<i>NAT2*14I</i>	191G>A (rs1801279) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Lento
<i>NAT2*14J</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 633G>A	Lento
<i>NAT2*14K</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 838G>A (rs56393504)	Lento
<i>NAT2*14L</i>	7A>G (rs200893121) 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983)	Lento
<i>NAT2*17</i>	434A>C (rs72554616)	Lento
<i>NAT2*18</i>	845A>C (rs56054745)	Rápido
<i>NAT2*19</i>	190C>T (rs1805158)	Lento
<i>NAT2*20</i>	600A>G (rs72466461)	?
<i>NAT2*21</i>	458C>T (rs72466460)	?
<i>NAT2*22</i>	609G>T (rs45618543)	?
<i>NAT2*23</i>	70T>A (rs45477599)	?
<i>NAT2*24</i>	403C>G (rs12720065)	?
<i>NAT2*25</i>	665T>G	?
<i>NAT2*26</i>	809T>C	?
<i>NAT2*27</i>	589C>T	?

2. Pareja de oligonucleótidos para el amplicón de *NAT2*

Forward	NATF
Secuencia	5'- TAACATGCATTGTGGGCAAGC -3'
Tamaño	21 bases
Posición	13879..13899
% GC	47.6
Tm (°C)	56.7
Proveedor	Integrated DNA Technologies

Reverse	NATR
Secuencia	5'- TGGGTGATACATACACAAGGG -3'
Tamaño	21 bases
Posición	14651..14671
% GC	47.6
Tm (°C)	54.2
Proveedor	Integrated DNA Technologies

3. Pareja de oligonucleótidos para el amplicón de *CYP2E1*

Forward	CYPF
Secuencia	5'- AACGCCCTTCTTGGTTCAG -3'
Tamaño	20 bases
Posición	3714..3733
% GC	55.0
Tm (°C)	57.9
Proveedor	Integrated DNA Technologies

Reverse	CYPR
Secuencia	5'- ACAGACCCTCTTCCACCTTCTA -3'
Tamaño	22 bases
Posición	4105..4126
% GC	50.0
Tm (°C)	57.0
Proveedor	Integrated DNA Technologies

4. Pareja de oligonucleótidos para el amplicón de *GSTM1*

Forward	GSTF
Secuencia	5'- CGTGTTCCTCCCTGTGAGATG -3'
Tamaño	20 bases
Posición	8759..8778
% GC	60.0
Tm (°C)	57.9
Proveedor	Integrated DNA Technologies

Reverse	GSTR
Secuencia	5'- CAAACTGATTGACCCTGGCAT -3'
Tamaño	21 bases
Posición	9223..9243
% GC	47.6
Tm (°C)	55.7
Proveedor	Integrated DNA Technologies