



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
TESIS DE POSGRADO

RELACIÓN DE LOS FENOTIPOS ACETILADORES DEL GEN
NAT2 CON LA INJURIA HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS
ANTITUBERCULOSOS EN PACIENTES PERUANOS
UNIVERSIDAD DE SAN MARTÍN DE PORRES

2016-2017

PRESENTADA POR
LINA ROCÍO LAYMITO CHUMBIMUNI

ASESOR
MG. ÓSCAR ACOSTA CONCHUCOS

TESIS
PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INMUNOLOGÍA
CON MENCIÓN EN INFECTOLOGÍA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

LIMA – PERÚ

2020



Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA

El autor permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIDAD DE POSGRADO**

**RELACIÓN DE LOS FENOTIPOS ACETILADORES DEL GEN
NAT2 CON LA INJURIA HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS
ANTITUBERCULOSOS EN PACIENTES PERUANOS
UNIVERSIDAD DE SAN MARTÍN DE PORRES
2016-2017**

TESIS

**PARA OPTAR
EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INMUNOLOGÍA CON
MENCIÓN EN INFECTOLOGÍA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

**PRESENTADA POR
LINA ROCÍO LAYMITO CHUMBIMUNI**

**ASESOR
Mg. ÓSCAR ACOSTA CONCHUCOS**

**LIMA, PERÚ
2020**

JURADO

Presidente: PhD. Joel de León

Miembro: Dr. Arturo Pareja

Miembro: PhD. Edward Valencia

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo incondicional;
a mi hermana Delia por sus consejos;
a Valeria, por su infinito amor

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Ricardo Fujita, la Doctora María Luisa Guevara, al Magister Oscar Acosta y al Doctor Teodoro Oscanoa por los consejos durante la realización del trabajo de investigación.

Al FONDECYT por la subvención económica al proyecto con contrato/convenio CONV-090-2014-FONDECYT-DE que ha permitido la realización de la tesis.

Al Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular, por permitirme incorporarme a un ambiente óptimo para el desarrollo de la tesis.

A mis amigos del trabajo, Daisy, Rodrigo, Angelo, Steve, Pierina que siempre me apoyaron en cualquier problema suscitado.

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. METODOLOGÍA	7
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES	30
FUENTES DE INFORMACIÓN	31
ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1. Fenotipos acetiladores de acuerdo a los genotipos del gen <i>NAT2</i> .	11
Tabla 2. Master mix de secuenciamiento para el gen <i>NAT2</i> .	20
Tabla 3. Datos bioquímicos de casos y controles.	25
Tabla 4. Características generales de casos y controles.	26
Tabla 5. Variantes genéticas conocidas y nuevas del gen <i>NAT2</i>	28
Tabla 6. Genotipos y alelos del gen <i>NAT2</i> .	29
Tabla 7. Síntesis de los fenotipos acetiladores <i>NAT2</i> del grupo de casos y controles.	32
Tabla 8. Asociación entre los fenotipos acetiladores del gen <i>NAT2</i> con IHIMA y No IHIMA	33
Tabla 9. <i>Primers</i> sintetizados para el gen <i>NAT2</i>	46
Tabla 10. Detalle de los valores numéricos del proyecto.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Ciclo bioquímico de la Isoniacida (INH).	13
Figura 2. Algoritmo de selección de los 60 participantes incluidos en el estudio como casos (30) y controles (30).	17
Figura 3. Aplicación de las técnicas RFLP y el secuenciamiento Sanger para determinar los genotipos de las variantes genéticas rs1799929, rs1799930 y rs1799931. A) RFLP aplicada a las muestras para identificar los genotipos CC, CT y TT en rs1799929; B) RFLP aplicada a las muestras para identificar los genotipos GG, GA y AA en rs1799930; C) RFLP aplicada a las muestras rs1799931 para identificar los genotipos GG, GA y AA; D) Secuencias de ADN determinadas por secuenciamiento Sanger, alineadas con el programa Bioedit. Los códigos Y y R indican la existencia de alteración genética.	27
Figura 4. Número total de "casos" (IHIMA) y "controles" (No-IHIMA), agrupados en base a cada tipo de fenotipo acetilador. SA, acetilación lenta; IA, acetilación intermedia, intermedia, RA, acetilación rápida.	31
Figura 5. Comparación entre el grupo de casos (IHIMA) y controles (No-IHIMA) respecto a los fenotipos acetiladores rápido e intermedio (RA+IA; barra verde) y lento (SA; barra amarilla). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (X^2 , $p>0.05$)	31

RESUMEN

Objetivo: Relacionar los fenotipos acetiladores del gen *NAT2* con la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos (IHIMA) en pacientes peruanos.

Metodología: Se evaluó pacientes tuberculosos con y sin injuria hepática (30 en cada grupo) según criterio *Drug-Induced Liver Injury Network* (DILIN). Se empleó técnicas moleculares como RFLP, Secuenciamiento Sanger, NGS (*Target sequencing* y *Exome sequencing*) para registrar los diferentes genotipos de *NAT2*. El análisis bioinformático incluyó la anotación de variantes genéticas conocidas y nuevas con diversas herramientas de predicción clínico utilizando los programas VarScan, VEP, SnpEff y SnpSift.

Resultados: Se evaluó las variantes rs1799929, rs1799930 y rs1799931 para definir fenotipos acetiladores del gen *NAT2*, encontrándose diferencias no significativas entre el grupo IHIMA (SA=43%, IA=43% y RA=14%) y No-IHIMA (SA=40%, IA=56% y RA=4%) con un OR 1.14 95% IC [0.41-3.2] $p= 0.7934$. También se encontraron cuatro variantes nuevas que se desconoce su relación con la condición IHIMA.

Conclusión:

No existe relación los fenotipos acetiladores del gen *NAT2* con la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos (IHIMA) en esta muestra de pacientes peruanos, sin embargo, es importante destacar que los fenotipos acetiladores *NAT2* lento, tienen una frecuencia media en ambos grupos IHIMA y No-IHIMA.

Palabras clave: Tuberculosis, IHIMA, gen *NAT2*, fenotipos acetiladores

ABSTRACT

Objective: Relate the acetylating phenotypes of *NAT2* gene with liver injury induced by anti-tuberculosis drugs (IHIMA) in Peruvian patients.

Methodology: Tuberculosis patients with and without liver injury (30 in each group) were evaluated according to the Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) criteria. Molecular techniques such as RFLP, Sanger Sequencing, NGS (Target sequencing and Exome sequencing) were used to record genotypes and alleles of the genetic variants of the gene. Bioinformatic analysis included annotation of new and known genetic variants with various clinical prediction tools using the VarScan, VEP, SnpEff and SnpSift programs.

Results: Variants rs1799929, rs1799930 and rs1799931 were evaluated to define acetylating phenotypes of *NAT2* gene, finding non-significant differences between the IHIMA group (SA = 43%, IA = 43% and RA = 14%) and Non-IHIMA (SA = 40%, IA = 56% and RA = 4%) with an OR 1.14 95% CI [0.41-3.2] $p = 0.7934$. Four new variants were also found that are not related to IHIMA.

Conclusion:

There is no relationship between the acetylating phenotypes of *NAT2* gene with liver injury induced by antituberculous drugs (IHIMA) in this sample of Peruvian patients, however, it is important to highlight that the slow and intermediate *NAT2* acetylating phenotypes have an average frequency in both IHIMA and No-IHIMA groups.

Keywords: Tuberculosis, IHIMA, *NAT2* gene, acetylators phenotypes.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad pulmonar infectocontagiosa, cuya primo-infección se da en el pulmón y posteriormente puede invadir otros órganos del cuerpo, causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) causante de la mayor morbilidad y mortalidad que ha afectado a la humanidad a lo largo de su historia. Se trasmite a través de aerosoles contaminados de bacilos de una persona infectada a otra sana por vía aérea ¹.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta el 2018, estimó aproximadamente 10 millones de casos nuevos registrados a nivel mundial, esto depende de la carga de morbilidad de cada país, desde menos de 5 a más de 500 nuevos casos por 100 mil habitantes. Otro problema grave es la tuberculosis farmacorresistente, donde se estimó que medio millón de casos nuevos de tuberculosis son resistentes a rifampicina ⁴.

En el Perú, la TB ocupa el décimo quinto lugar de las causas de muerte y estimó 37 mil casos de TB, con una tasa de incidencia de 119 casos /100 mil habitantes y 2 mil defunciones ¹. En el 2015 el 80% de los casos fueron registrados en Lima Metropolitana (80.5%) (Lima Este, Lima Ciudad y Lima Sur), El Callao (86%), La Libertad (42.6%), Loreto (66.2%), Ica (70.5%), Junín (26.3%), Lambayeque (38.4%), Arequipa (25.3%) y Ucayali (104%). Asimismo, se notificaron el 70,2% de MR-TB y el 75% de los casos de TB con resistencia extendida (XR-TB) ^{1,3}. En tanto, el Ministerio de Salud (MINSA) enfoca programas de prevención y cuidado en el control de la TB, lamentablemente la inespecificidad, inexactitud y retraso en el diagnóstico causa abandono e incremento de cepas resistentes de MTB.^{1,5}.

Según el MINSA, el tratamiento estándar usa una combinación de fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) y segunda línea (fluoroquinolonas, kanamicina, capreomicina y amikacina) ³.

El mecanismo farmacológico de la rifampicina es bactericida sobre *Mycobacterium tuberculosis* y presenta actividad variable frente a otras especies atípicas. Inhibe la

ARN-polimerasa dependiente de ADN de las cepas bacterianas sensibles, sin afectar los sistemas enzimáticos del hospedero. La isoniazida también es bactericida sobre aquellas poblaciones bacterianas de crecimiento acelerado, donde su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ácido micólico, componente importante de la pared celular bacteriana. La pirazinamida es por medio de la inhibición del sistema FAS I en la síntesis del ácido micólico de la micobacteria. El etambutol, en el interior de la bacteria, suprime la síntesis de ARN-polimerasa en el proceso de multiplicación.^{5,6}

La eficacia de los fármacos siguen un ciclo metabólico, sin embargo, algunos pacientes sufren reacción adversa produciendo hepatotoxicidad que conlleva a injuria hepática. La Isoniazida y pirazinamida son los principales fármacos involucrados en el inicio de estos procesos tóxicos⁶.

En términos genéticos, denominamos genotipo a la información genética que posee un organismo. Fenotipo son las características físicas visibles de un determinado ambiente. Un alelo es cada una de las dos o más variantes de un gen, un individuo hereda dos alelos para cada gen, uno del padre y el otro de la madre, es decir, el genotipo es el conjunto de alelos, siendo el haplotipo la combinación de uno a varios alelos (REF).

Tabla 1. Fenotipos acetiladores de acuerdo a los genotipos del gen *NAT2*.

NAT2 *5 KPNI rs1799929	NAT2 *6 TAQI rs1799930	NAT2 *7 BAMHI rs1799931	Genotipo acetilador	Estado acetilador
CC	GG	GG	NAT2 *4/4	RA (rápido)
CT	GG	GG	NAT2 *4/5	IA (intermedio)
CC	AG	GG	NAT2 *4/6	IA
CC	GG	AG	NAT2 *4/7	IA
TT	GG	GG	NAT2 *5/5	SA (lento)
CT	AG	GG	NAT2 *5/6	SA
CT	GG	AG	NAT2 *5/7	SA
CC	AA	GG	NAT2 *6/6	SA
CC	AG	AG	NAT2 *6/7	SA
CC	GG	AA	NAT2 *7/7	SA

Fuente: Xiang *et al*, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0085905⁹.

La injuria hepática inducida por medicamentos antituberculosos (IHIMA), llamada también lesión o daño hepático, se origina por la reacción adversa a medicamentos, siendo fatal si no se detecta a tiempo. A nivel hepático, la isoniacida, la rifampicina, la pirazinamida y el etambutol promueven muerte celular programada (apoptosis), inhibición de la respiración y/o beta-oxidación mitocondrial, bloqueo de las bombas de transporte celular, excreción de los metabolitos o residuos durante el tratamiento (quimioterapia).²⁴ Por tanto, es importante conocer los parámetros bioquímicos de los hepatocitos en el ser humano, tales como las transaminasas, fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina y gamma glutamiltransferasa (GGT). En este sentido, la Alaninoaminotransferasa (ALT), se encuentra en el interior de las células hepáticas, pero cuando el hígado se inflama o se lesiona, libera esta enzima en el torrente sanguíneo. Asimismo, la elevación de la FA sugiere una obstrucción de las vías biliares, la elevación de la bilirrubina indica destrucción de glóbulos rojos y el incremento de la GGT induce hiperactividad de las mitocondrias. Estas enzimas en conjunto están asociadas mutuamente para determinar el diagnóstico de injuria hepática basado en el criterio de *Drug-Induced Liver Injury Network* (DILIN) ¹⁴⁻²⁰.

IHIMA estaría determinada por variantes genéticas, como el polimorfismo del gen N-acetyltransferasa 2 (*NAT2*) las cuales son: rs1799929, rs1799930 y rs1799931, las cuales permite establecer fenotipos acetiladores lentos (SA: ambos alelos mutados), intermedios (IA: un alelo normal y otro mutado) y rápidos (RA: alelos normales o *wild type*) (Tabla 1)⁷⁻⁹.

El gen *NAT2* se localiza en el cromosoma 8, del brazo p, de la región 22. Otros estudios, proponen una nueva clasificación fenotípica, indicando a los haplotipos *NAT2*6* y *NAT2*7* como acetiladores ultra bajos en relación al haplotipo *NAT2*5* ^{24,25}. Además, fue demostrado que el fenotipo acetilador lento podría ser un posible factor de desarrollo de tumores y leucemias ²⁶.

Así mismo, varios autores realizaron estudios meta analíticos del gen *NAT2* relacionado con la hepatotoxicidad, determinando que el fenotipo SA con la

intervención de la primera línea de fármacos antituberculosos conlleva al daño hepático y con alto riesgo de IHIMA ^{13,28-33}. En personas con fenotipo SA, la enzima NAT2 acetila fármacos antituberculosos lentamente, generando altas concentraciones de medicamentos en el plasma, y la activación metabólica de la acetil hidracina se satura y no genera diacetilhidrazina (metabolito no tóxico), por tanto se acumula residuos tóxicos y esto aumenta el efecto de hepatotoxicidad. En cambio, en las personas con fenotipo RA, la reacción es instantánea y reduce el efecto tóxico. (Figura 1) ³⁴⁻³⁷.

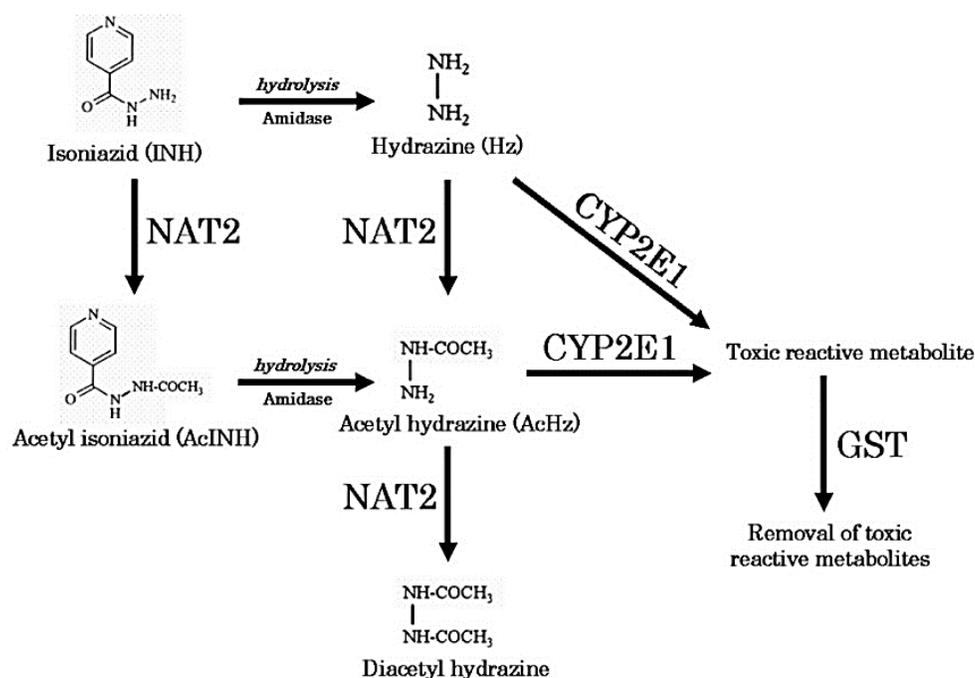


Figura 1. Ciclo bioquímico de la Isoniacida (INH) ²³.

Hasta el momento no se ha estudiado la relación entre la variabilidad genética del gen *NAT2* y el riesgo de padecer IHIMA en la población peruana. Debido a que las variantes genéticas se encuentran repartidas en diferentes proporciones en los diferentes países, estudios de Europa o África no van a tener la misma validez en países sudamericanos. Por tanto, determinar las variantes predisponentes en las poblaciones peruanas tendrá validez para pacientes con nuestro perfil genético,

puesto que en Lima tiene un promedio de 70% de ancestría nativa peruana y casi 100% en las zonas rurales del interior del país.⁵⁰

La identificación del componente genético que predispone el desarrollo de IHIMA en pacientes peruanos con TB, mediante tecnología genómica, es el principal aporte científico de esta investigación. La identificación de variantes genéticas con potencial valor predictivo al desarrollo de IHIMA en pacientes con TB, permitirá prevenir una reacción adversa que puede dañar irreversiblemente el hígado o causar la muerte. Lo anterior constituye el principal aporte práctico de este estudio.

Hipótesis de investigación:

Existe relación entre los fenotipos SA, IA y RA del gen *NAT2* y la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos en pacientes peruanos atendidos en Hospital Guillermo Almenara, durante el periodo 2016-2017.

Objetivo general:

Determinar la relación entre los fenotipos acetiladores, generados por las variantes genéticas del gen *NAT2*, y la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos en pacientes peruanos.

Objetivos específicos:

- Caracterizar la injuria hepática en pacientes con TB, en base a los parámetros bioquímicos considerados por el *Drug-Induced Liver Injury Network*.
- Determinar la frecuencia de los genotipos y alelos de los rs1799929, rs1799930 y rs1799931 del gen *NAT2* en base a IHIMA y No-IHIMA.
- Relacionar los fenotipos acetiladores de rs1799929, rs1799930 y rs1799931 con las manifestaciones clínicas de IHIMA y No-IHIMA en pacientes con TB.

II. METODOLOGÍA

2.1 Tipos de estudio y diseño

Estudio de enfoque cuantitativo, observacional, analítico, transversal, casos y controles.

2.2 Diseño muestral

2.2.1 Población universo

Se consideran 109 pacientes diagnosticados con tuberculosis, provenientes del Hospital Guillermo Almenara, durante el periodo 2016-2017.

2.2.2 Población de estudio

Pacientes mayores de 18 años diagnosticadas con TB. El grupo IHIMA serán considerados “casos” y el grupo No-IHIMA será considerado “controles”.

2.2.3 Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño muestral para este diseño de casos y controles, se utilizó la frecuencia de exposición al **factor “acetilador lento” NAT2** en los casos (78%) y en los controles (42%) según datos de referencia de Mahmoud *et al* ³¹ considerando un OR de 2.5, un nivel de confianza de 95% y una potencia de 80%, resultando un tamaño muestral mínimo de 28 casos y 28 controles. Finalmente, se evaluaron en total 60 personas: 30 casos y 30 controles. El reclutamiento de los pacientes fue a través del método no probabilístico, a través de un muestreo por conveniencia (Figura 2).

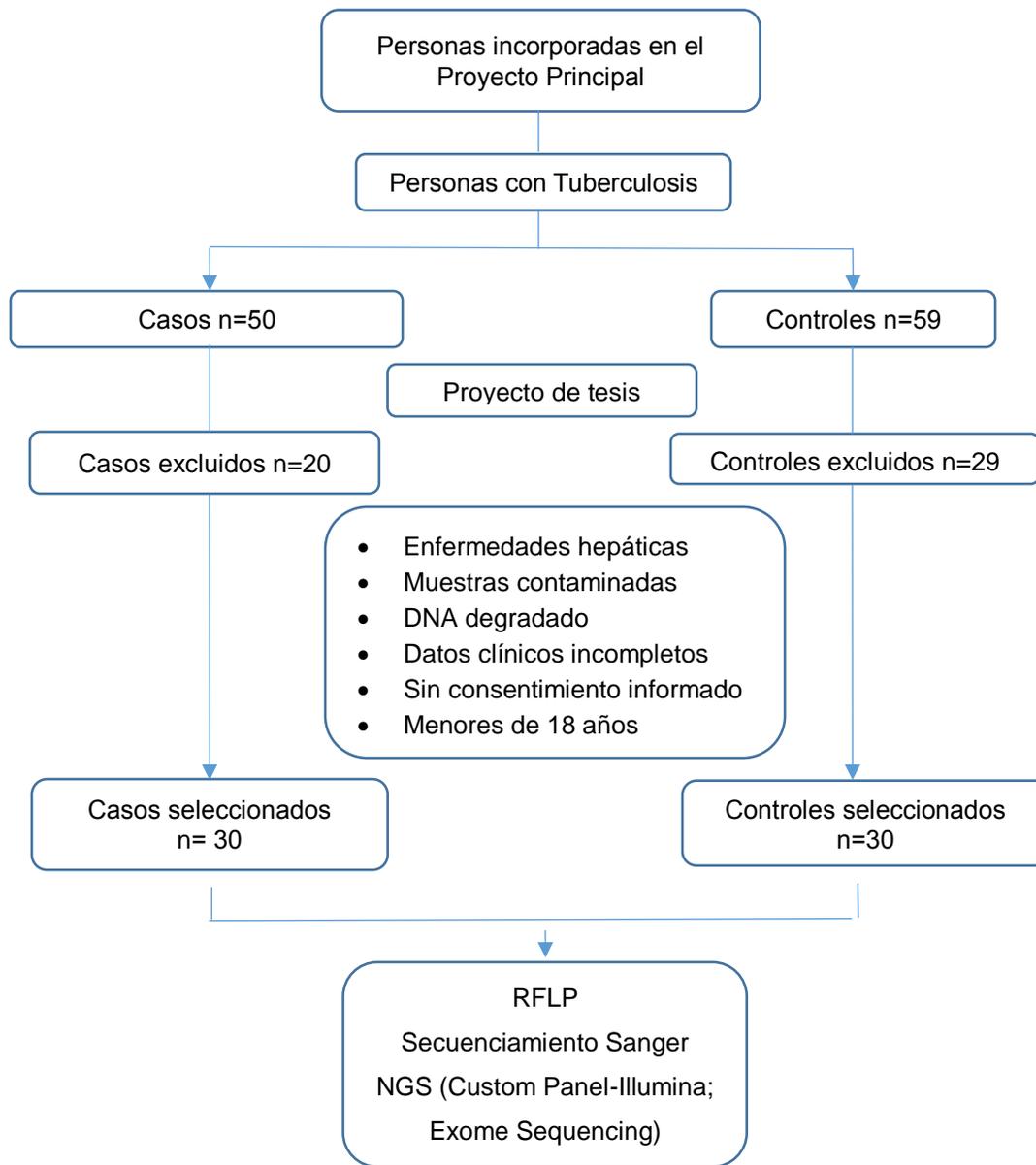


Figura 2. Algoritmo de selección de los 60 participantes incluidos en el estudio como casos (30) y controles (30).

2.2.4 Criterios de selección

- Criterios de inclusión:
 - Pacientes con TB, con y sin injuria hepática, con tratamiento de fármacos antituberculosos
 - Mayores de 18 años de edad
 - Pacientes que manifiesten su voluntad de participar a través de la firma del consentimiento informado.

- Criterios de exclusión:
 - Pacientes con TB diagnosticados con alguna enfermedad hepática preexistente con distinta manifestación clínica de IHIMA.

2.3 Técnica y procedimientos de recolección de datos

2.3.1 Diagnóstico de Injuria Hepática

Los criterios que se utilizaron para el diagnóstico de IHIMA han sido descritos por el *Drug-Induced Liver Injury Network* (DILIN).⁴⁰ Se diagnostica según los siguientes criterios:

1. Pruebas bioquímicas hepáticas séricas elevadas antes de iniciar el tratamiento con el fármaco; elevación por encima de 5 veces del límite superior normal de la transaminasa alanina aminotransferasa (ALT) en dos ocasiones consecutivas.
2. Pruebas bioquímicas hepáticas séricas elevadas antes de iniciar el tratamiento con el fármaco; elevación por encima de 5 veces del límite superior normal de la transaminasa aspartato-aminotransferasa (AST) en dos ocasiones consecutivas

3. En dos ocasiones consecutivas elevación por encima de 2 veces el límite superior normal de la fosfatasa alcalina sérica y la bilirrubina total en suero mayor de 2.5mg/dL.

2.3.2 Procedimiento de recolección de datos

En el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, se colectaron muestras de sangre de 3mL, en tubos *BD Vacutainer* con EDTA K2. Las muestras se trasladaron al laboratorio del Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular (CIGBM), en la Facultad de Medicina humana de USMP. Se aseguró el mantenimiento de la cadena de frío (4°C), para evitar la degradación y la hemólisis de los componentes celulares.⁴²

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el protocolo de *Salting Out* validado por Miller S. *et al*, 1987⁴³. Para ello, se procedió a la lisis celular que separa las proteínas y los lípidos. Luego se procedió a lavar con etanol absoluto (grado molecular) y finalmente con etanol de 70%, con el objetivo de romper la capa hidratante y exponer los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permite que el ácido nucleico precipite, dejando expuesta la molécula.²⁸ Finalmente se diluyó el ADN en buffer TE 10:1 y se cuantificó en el equipo de Nanodrop. Se utilizaron 100ng/ μ L para proceder con las siguientes técnicas moleculares.

El ADN aislado de cada muestra se purificó utilizando el *GeneJet Genome DNA Purification kit* (Thermo Scientific, Lot.00377776). Luego se estandarizó una PCR convencional para un fragmento de 1093pb del exón 2 del gen *NAT2*, dando como resultado para un volumen final de 25 μ L: 0.3 μ L de Taq ADN polimerasa, 2.5 μ L de Buffer taq + KCl, 0.5 μ L de desoxinucleotidos (dNTPs), 3 μ L de $MgCl_2$ y 0.31 μ L de cada primer (Tabla 9). A continuación, se amplificaron las muestras en el Termociclador ProflexTM Base (Applied biosystems, cat. 297804898) según las siguientes condiciones en el ensayo de PCR: denaturación de un ciclo a 95°C por

5 minutos, *annealing* de 35 ciclos a 95° por 45 segundos, 57°C por 45 segundos y 72°C por 1:30 minutos, y la extensión de un ciclo a 72°C por 5 minutos. Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para identificar la amplificación del fragmento del gen *NAT2*.

2.3.3 Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

El método molecular de RFLP detectó las variantes alélicas mediante enzimas de restricción *KpnI*, *TaqI* y *BamHI*, (Thermo Scientific, Lot. 00427256) y se realizó la digestión de las muestras a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en una cámara electroforética. El gel se tiñó con bromuro de etidio por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se observó las bandas en los sitios de corte de cada enzima para su respectivo registro.

2.3.4 Secuenciamiento Sanger

El secuenciamiento Sanger identificó los polimorfismos del gen *NAT2*. Para ello se utilizó 3.5 ul de amplificado purificado por cada muestra. Luego se empleó el *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)*. El producto de la reacción traslada a una placa de PCR-96-C de 0.2mL. La Tabla 2 muestra el *master mix* del secuenciamiento para el fragmento del gen *NAT2*.

Tabla 2. *Master mix* de secuenciamiento para el gen *NAT2*

Reactivos	Volumen
<i>BigDye terminator</i>	2.2 µL
<i>BigDye Buffer terminator 5x</i>	2.0 µL
Primer Forward- <i>NAT2</i>	0.18 µL
Agua de PCR	2.12 µL
Amplificado purificado de ADN	3.5 µL
Total	10 µL

Se amplificaron las muestras en el termociclador ProFlex™ en condiciones de denaturación a 96°C por 1 minuto, 96°C por 10 segundos, para la hibridación 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos, en un total de 25 ciclos y una extensión de 4°C. Al producto purificado de PCR, se añadió 2 µL de la mezcla EDTA 125 mM, 2 µL Acetato de Sodio 3M y 50 µL de etanol absoluto, luego se centrifugó la placa a 3500RPM por 45 minutos a 4°C. Según normativa del protocolo del laboratorio, se eliminó el sobrenadante mediante una centrifugación de 1240RPM por un minuto a 4°C, después se agregó 70ul de etanol frío al 70% y se volvió a centrifugar a 3500RPM por 15 minutos. Luego, los productos se resuspendieron con 15 µL de formamida, siguiente, se denaturalizó a 95°C por 5 minutos en el termociclador y se colocó inmediatamente en hielo (shock térmico) por 3 minutos y finalmente se llevó al Analizador genético ABI-3500 (*Applied Biosystems*, N° de serie 23133-241).

En la parte del análisis del proceso de secuenciamiento, se exploró las variantes genéticas por el programa *SerialCloner* v2.6.1, luego se identificó éstas mediante la base de datos del NCBI y finalmente se alineó en el programa *BioEdit* lo cual determinó la posición de los polimorfismos genéticas del gen *NAT2*.

2.3.5 Next Generation Sequencing (NGS)

El secuenciamiento masivo NGS (*target sequencing* y *exome sequencing*), por el equipo *MiSeq* y *NextSeq Illumina*, se obtuvo paneles genéticos en bruto (librerías genómicas) por cada paciente. Para el análisis bioinformático se realizó un control de calidad de los READS por medio del programa FASTQC, filtrado de calidad por medio de los softwares PRINSEQ, TRIMGALORE y TRIMMOMATIC. A continuación, se realizó un alineamiento con el genoma de referencia HG19 (Cromosoma 37), se procedió a la conversión de SAM a BAM (extensiones de archivos) por medio del programa SAMTOOLS. Se removió las duplicaciones por el programa PICARD-MarckDuplicates. Luego, la llamada de coordenadas con el programa PICARD-SORTSAM. Después, la llamada de variantes por medio de

VarScan y finalmente la anotación de las variantes genéticas por medio del programa Variation effect predictor (VEP) y el código abierto que anota variantes y predice sus efectos sobre los genes mediante el uso de un enfoque de bosque a intervalos (SnpEff).

El almacenamiento de los datos obtenidos se guardó en una hoja de cálculo en el programa Microsoft Excel. Se realizó el control de calidad para eliminar datos incompletos mediante revisión simple.

2.4 Procesamiento y análisis de los datos

La identificación y clasificación de los fenotipos acetiladores del gen *NAT2* fue en base a la Tabla 1, las cuales determina a tres polimorfismos genéticos principales: rs1799929, rs1799930 y rs1799931.⁹ Después de la clasificación mencionada, el análisis de los resultados logró identificar las variables para el estudio principal.

A partir de la historia clínica entre casos y controles se obtuvo las variables cuantitativas, entre ellas tenemos: “edad” en años, “pruebas bioquímicas” como la Alanina aminotrasferasa (alt), fosfatasa alcalina (fa), bilirrubina y gamma glutamil transferasa (ggt) en valores numéricos. Mientras que las variables cualitativas o categóricas como la “condición”, “fenotipos acetiladores” tienen indicación valorizada “cero”, “uno” y “dos” para finalmente ser analizada en el programa STATA v12.0⁴⁴.

En el programa estadístico, se agregó y se definió las variables dependiendo si son cualitativas y cuantitativas. Seguido de verificar si las variables tienen distribución normal, el resultado fue que no tienen distribución normal. Se empleó pruebas no paramétricas en todo el estudio. Luego, para la tabla de las características generales y bioquímicas de los casos y controles, se realizó un *summary* de media, desviación estándar (*sd*), mediana (*p50*), rango (*max* y *min*) por condición.

Para las variables cuantitativas discretas y continuas, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney y se observó si existe diferencias significativas ($p < 0.05$). En cambio, para variables categóricas se realizó la prueba de Chi Cuadrado X^2 .

Para la asociación entre los fenotipos acetiladores y los casos y controles, se utilizó las formas cualitativas empleando la prueba de Chi Cuadrado X^2 y también se incluyó el análisis de regresión lineal para obtener el Odds Ratio (OR) con el 95% IC (intervalo de confianza).

2.5 Aspectos éticos

El estudio de investigación es parte del proyecto “Perfil inmunogenómico y farmacogenómico para determinar la predisposición a hepatotoxicidad por tratamiento antituberculoso en pacientes peruanos” que abarca el estudio polimórfico de 100 genes para determinar los fenotipos acetiladores, genotipos y alelos de los pacientes peruanos y asociarlos entre ellos, también comparar los resultados con investigaciones internacionales (proyecto 1000 genomas, $n=85$). Este proyecto recibió la aprobación del Comité Institucional de Ética en la Investigación de la Facultad de Medicina humana, Universidad de San Martín de Porres (21 de julio del 2015); con número de oficio 982-2015-CIEI-USMP-CCM. Adicionalmente, este trabajo recibió la autorización del propio comité (oficio N° 491-2018-CIEI-FMH-USMP). La información que se obtendrá en la base de datos será utilizada para fines de investigación.

III. RESULTADOS

3.1 Características bioquímicas

El análisis de los promedios de los valores obtenidos del análisis bioquímico mostraron los siguientes resultados: En la tabla 3, para las transaminasas, en el grupo de “casos”, el promedio fue de 300.17 ± 361.68 U/L, lo cual es cinco veces más que el valor normal; mientras que en el grupo de “controles” el promedio fue 28.87 ± 15.31 U/L, siendo el menor valor 10 U/L y el mayor 1780 U/L entre ambos grupos. Para la Fosfatasa Alcalina (FA), en el grupo de “casos” el promedio fue de 289.87 ± 189.2 U/L, dos veces más que el valor normal, y en el grupo de “controles” el promedio fue de 152.87 ± 142.8 U/L, siendo el menor valor de 73 U/L y el mayor de 907 U/L entre ambos grupos. Para la Bilirrubina, en el grupo de “casos” el promedio fue de 1.83 ± 1.89 mg/dL, tres veces mayor que el valor normal, y en el grupo de “controles” el promedio fue 0.6 ± 0.32 mg/dL siendo el menor valor 0.23 mg/dL y el mayor 9.5 mg/dL entre ambos grupos. Para la Gamma Glutamil Transferasa (GGT), en el grupo de los “casos” el promedio fue de 279.4 ± 263.19 U/L, tres veces más del límite normal, y en el grupo de “controles” el promedio fue de 78.37 ± 176.81 U/L, siendo el menor valor 11 U/L y el mayor 1260 U/L entre ambos grupos.

El cuadro resumen de las variables cuantitativas entre el grupo de “casos” y “controles” se muestra en la Tabla 4. La edad promedio de los casos fue de 37.6 ± 14.61 años y de los controles 42.93 ± 19.13 . La edad más frecuente entre ambos grupos fue 27 años (casos: mínimo 18 años y máximo 76 años; controles: mínimo 18 años y máximo 79 años). No hubo significación estadística respecto a la comparación de edad en ambos grupos de estudio ($p=0.4549$). Con respecto al sexo, tampoco se detectaron diferencias en la distribución entre casos y controles ($p=0.4379$).

Tabla 3. Datos bioquímicos de los casos y controles.

	Casos (IHIMA), n(%)	Controles (No-IHIMA), n(%)	Valor p
<u>DATOS BIOQUÍMICOS</u>	n=30	n=30	
TRANSAMINASAS (ALT)			
Promedio	300.17	28.87	0.0001*
Mediana	202	25.5	
Desv. Stand.	361.68	15.31	
Rango	[29-1780]	[10-84]	
FOSFATASA ALCALINA (FA)			
Promedio	289.87	152.87	0.0003*
Mediana	266.5	102.5	
Desv. Stand.	189.2	142.8	
Rango	[73-907]	[77-791]	
BILIRRUBINA			
Promedio	1.83	0.6	0.0001*
Mediana	1.34	0.5	
Desv. Stand.	1.89	0.32	
Rango	[0.4-9.5]	[0.23-1.7]	
GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA (GGT)			
Promedio	279.4	78.37	0.0001*
Mediana	256.5	35.5	
Desv. Stand.	263.19	176.81	
Rango	[16-1260]	[11-998]	

ALT: Alanina aminotrasferasa; FA: Fosfatasa alcalina; GGT: Gamma Glutamil Transferasa. Valores normales: ALT: 10-49U/L, FA: 45-129 U/L, Bilirrubina total: 0.3-1.2 mg/dL, GGT: 0-73 U/L.

*Según Prueba de U de Mann Whitney.

Tabla 4. Características generales de los casos y controles

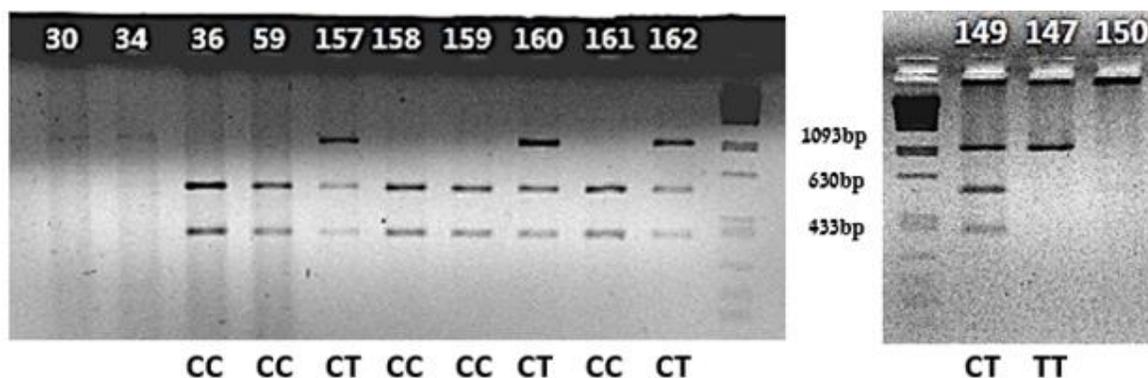
	Casos (IHIMA), n(%)	Controles (No-IHIMA), n(%)	Valor p
n=60	30	30	
EDAD	n=30	n=30	0.4549*
Promedio	37.6	42.93	
Mediana	34	36	
Desv. Stand.	14.61	19.13	
Rango	[18-76]	[18-79]	
SEXO			
Femenino	14 (46.67)	17 (56.67)	0.4379**
Masculino	16 (53.33)	13 (43.33)	

*Según Prueba de U de Mann Whitney. **Según prueba de Chi cuadrado X^2

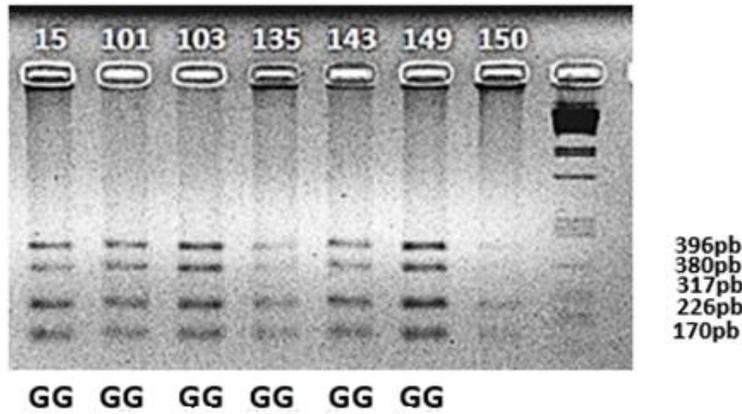
3.4 Variantes genéticas conocidas y nuevas del gen *NAT2*

Por medio de las técnicas moleculares como RFLP y Secuenciamiento Sanger se generó los genotipos de las variantes genéticas rs1799929, rs1799930 y rs1799931, a partir del cual se determinó los fenotipos acetiladores *NAT2*. En la Figura 3, primero se observa las bandas que define los genotipos por muestra y segundo las secuencias genéticas que fueron alineadas mediante el programa Bioedit. Estos procedimientos asignan los genotipos acetiladores *NAT2*.

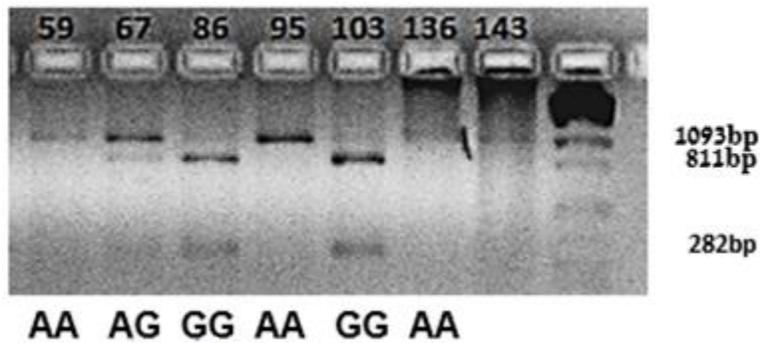
A)



B)



C)



D)

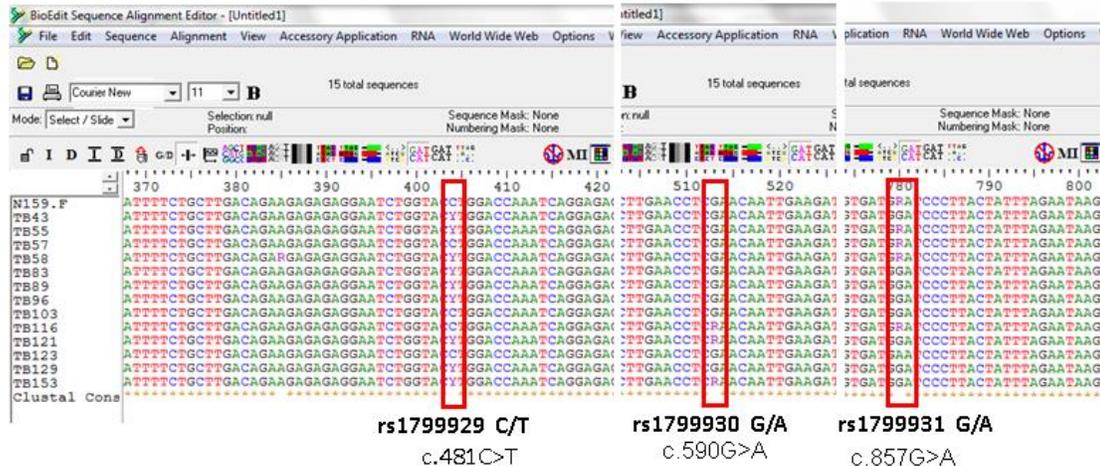


Figura 3. Aplicación de las técnicas RFLP y el secuenciamiento Sanger para determinar los genotipos de las variantes genéticas rs1799929, rs1799930 y rs1799931. A) RFLP aplicada a las muestras para identificar los genotipos CC, CT y TT en rs1799929; B) RFLP aplicada a las muestras para identificar los genotipos GG, GA y AA en rs1799930; C) RFLP aplicada a las muestras rs1799931 para identificar los genotipos GG, GA y AA;

D) Secuencias de ADN determinadas por secuenciamiento Sanger, alineadas con el programa Bioedit. Los códigos Y y R indican la existencia de alteración genética.

Por medio del análisis bioinformático se realizó el proceso de la anotación de las variantes genéticas de *NAT2*. Las variantes conocidas rs1799929, rs1799930 y rs1799931 fueron 96.4% para el grupo de “casos”, mientras que el grupo de “controles” fue de 97.2%. Sin embargo, las nuevas variantes fueron 3.6% en el grupo de los “casos” y 2.8% en el grupo de “controles”.

Tabla 5. Variantes genéticas conocidas y nuevas del gen *NAT2*

SNP ID	SECUENCIA CONTEXT	TIPO DE MUTACION	GEN	ALELO DE REFERENCIA	ALELO MUTADO	TIPO VARIANTE	POSICIÓN	CLINVAR	% REF ALELO	% VAR ALELO
rs1799929	Codificante	Variante sinónima	NAT2	C	T	SNV	c.481C>T / p.Leu161=	NA	C=0.66	T=0.34
rs1799930	Codificante	Variante sin sentido	NAT2	G	A	SNV	c.590G>A / p.Arg197Gln	Respuesta a drogas	G=0.83	A=0.17
rs1799931	Codificante	Variante sin sentido	NAT2	G	A	SNV	c.857G>A / p.Gly286Glu	Respuesta a drogas	G=0.89	A=0.11
rs1801280	Codificante	Variante sin sentido	NAT2	T	C	SNV	c.341T>C / p.Ile114Thr	Respuesta a drogas	T=0.64	C=0.36
rs1041983	Codificante	Variante sinónima	NAT2	C	T	SNV	c.282C>T / p.Tyr94=	Respuesta a drogas	C=0.71	T=0.29
rs1208	Codificante	Variante sin sentido	NAT2	G	A	SNV	c.803G>A / p.Arg268Lys	Respuesta a drogas	G=0.37	A=0.63
NN	Codificante	Variante sin sentido	NAT2	A	C	SNV	c.227A>C / p.Tyr76Ser	NN	NN	NN
NN	Codificante	Variante sinónima	NAT2	A	C	SNV	c.69A>C / p.Thr23=	NN	NN	NN
NN	Codificante	Variante sin sentido	NAT2	A	G	SNV	c.422A>G / p.Lys141Arg	NN	NN	NN
NN	Codificante	Variante sin sentido	NAT2	A	G	SNV	c.584A>G / p.Glu195Gly	NN	NN	NN

SNP ID: *Single nucleotide polymorphism*- Polimorfismo a variante genética, SNV: *Single nucleotide variant*, *ClinVar*. Significancia clínica, NN: No identificado.

En la tabla 5 se detalla cada mutación encontrada con sus respectivos indicadores de secuencia, tipo de mutación, gen, variante alélica, tipo de variable, posición, significancia clínica (*ClinVar*) y frecuencias poblacionales en América Latina.

Para este estudio de investigación, se analizaron los tres polimorfismos genéticos: rs1799929, rs1799930 y rs1799931 ⁹.

3.4 Genotipos y alelos del gen NAT2

Las frecuencias de los genotipos y alelos de las tres principales variantes genéticas se encuentran resumidas en la Tabla 6. El rs1799929 consta de los genotipos CC, CT y TT, para el grupo de los “casos”, las frecuencias fueron 66.69, 29,96 y 3.35 respectivamente, en cambio en el grupo de “controles” las frecuencias fueron 46.67, 46,67 y 6.66 respectivamente. Se observa que el genotipo TT solo posee una a dos personas en ambos grupos. Para la prueba estadística en este polimorfismo, resultó no significativo ($p=0.1180$). Sobre los alelos C y T, en comparación con los grupos “casos” y “controles”, resulta estadísticamente no significativo ($p=0.1355$).

Tabla 6. Genotipos y alelos del gen NAT2

POLIMORFISMO GENÉTICO	GENOTIPOS / ALELOS	Casos (IHIMA), n (%)	Controles (NO-IHIMA) n (%)	<i>p</i> *
rs1799929	CC	20 (66.69)	14 (46.67)	0.1180
	CT	9 (29.96)	14 (46.67)	
	TT	1 (3.35)	2 (6.66)	
	C	49 (81.67)	42 (70)	0.1355
	T	11 (18.33)	18 (30)	
rs1799930	GG	27 (90.25)	26 (87.12)	0.6876
	GA	3 (9.5)	4 (12.44)	
	AA	0 (0.25)	0 (0.4)	
	G	57 (95)	56 (93.34)	0.6969
	A	3 (5)	4 (6.66)	
rs1799931	GG	10 (34.04)	13 (43.33)	0.4257
	GA	15 (48.62)	16 (53.33)	
	AA	5 (17.34)	1 (3.33)	
	G	35 (58.34)	42 (70)	0.1827
	A	25 (41.66)	18 (30)	

*Según prueba χ^2 o test exacto de Fisher. Todas las frecuencias de los genotipos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El rs1799930 consta de los genotipos GG, GA y AA, para el grupo de los “casos”, las frecuencias fueron 90.25, 9.5 y 0,25 respectivamente, en cambio en el grupo de “controles” las frecuencias fueron 87.12, 12.44 y 0.4 respectivamente. Se observa en ambos grupos que nadie obtuvo el genotipo AA. Para la prueba estadística en este polimorfismo, el resultado obtenido resultó estadísticamente no significativo ($p=0.6876$). Sobre los alelos G y A, en comparación con los grupos “casos” y “controles”, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.6969$).

El rs1799931 consta de los genotipos GG, GA y AA, para el grupo de los “casos”, las frecuencias fueron 34.05, 48.62 y 17.34 respectivamente, en cambio en el grupo de “controles” las frecuencias fueron 43.33, 53.33 y 3.33 respectivamente. Se observa que el genotipo AA, solo posee una a 5 personas en ambos grupos. Para la prueba estadística en este polimorfismo, resulto no significativo ($p=0.4257$). Sobre los alelos G y A, en comparación con los grupos “casos” y “controles”, no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.1827$). Todas las frecuencias tanto en el grupo “casos” como “controles”, se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

La tabla 7 y la figura 4 se resume el fenotipo acetilador en ambos grupos de estudio. En el grupo de “casos” hubo similitud entre el fenotipo acetilador lento e intermedio con una frecuencia de 43%, mientras que el fenotipo acetilador rápido tuvo una frecuencia de 14%. En el grupo de “controles” el fenotipo acetilador intermedio tiene una mayor frecuencia (56.67%), mientras que el fenotipo acetilador lento y el fenotipo acetilador rápido tuvieron una frecuencia de 40% y 3.33%, respectivamente.

Fenotipos acetiladores	Casos (IHIMA), (%)	Controles (No-IHIMA), (%)
SA	13 (43)	12 (40)
IA	13 (43)	17 (56.67)
RA	4 (14)	1 (3.33)

Tabla 7. Síntesis de los fenotipos acetiladores NAT2 del grupo de casos y controles.

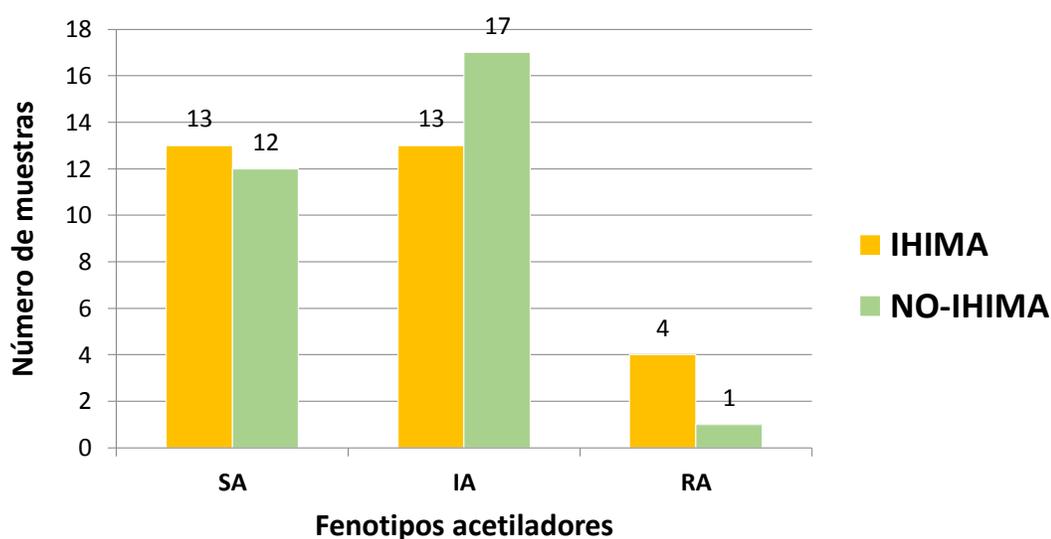


Figura 4. Número total de “casos” (IHIMA) y “controles” (No-IHIMA), agrupados en base a cada tipo de fenotipo acetilador. SA, acetilación lenta; IA, acetilación intermedia, intermedia, RA, acetilación rápida.

Se consideró combinar el número de participantes con fenotipo acetilador RA e IA, en ambos grupos de estudio, respecto al fenotipo acetilador SA, con la intención de agrupar aquellos individuos con similitudes en base a sus características generales (Figura 5). El resultado de este agrupamiento indica que las diferencias no son estadísticamente significativas, con un ($p \leq 0,5$), OR no ajustado.

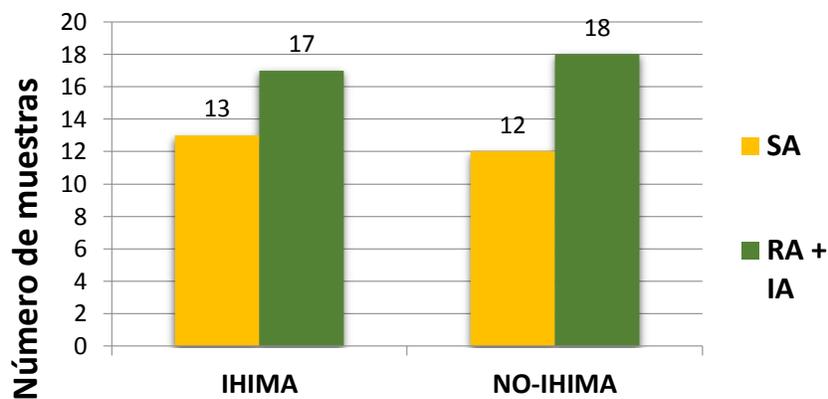


Figura 5. Comparación entre el grupo de casos (IHIMA) y controles (No-IHIMA) respecto a los fenotipos acetiladores rápido e intermedio (RA+IA; barra verde) y lento (SA; barra amarilla). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (χ^2 , $p>0.05$)

Tabla 8. Asociación entre los fenotipos acetiladores del gen *NAT2* con IHIMA y No IHIMA

Fenotipos acetiladores	IHIMA, n(%)	NO- IHIMA. n(%)	OR**	95% IC**	Valor P*
SA	13 (43)	12 (40)			
(RA) + (IA)	17 (57)	18 (60)	1.14	[0.41-3.2]	0.7934
	30 (100)	30 (100)			

RA: acetilación rápida, IA: acetilación intermedia y SA: acetilación lenta.

* Prueba de χ^2 . ** OR crudo

IV. DISCUSIÓN

La tuberculosis (TB) causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), es una enfermedad pulmonar infectocontagiosa causante de la mayor morbilidad y mortalidad que ha afectado a la humanidad a lo largo de su historia ¹.

Este estudio es el primer ensayo en Perú que determina la variabilidad genética del gen *NAT2* con relación a la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos (IHIMA). Para la presente investigación, el total de muestras (n=109) corresponde a pacientes con tratamiento antituberculoso procedente del Hospital Guillermo Almenara durante el periodo 2016 a 2017. En el estudio de casos y controles, se determinó, 30 casos y 30 controles, los cuales cumplieron los criterios de inclusión y exclusión respectivamente. Se analizaron los rs1799929, rs1799930 y rs1799931 de un fragmento de 1093 pb del gen *NAT2*, que identificó los fenotipos acetiladores necesarios para la descripción de un posible perfil genético, es decir, un diagnóstico de IHIMA, por participantes.

IHIMA causa el irreversible daño hepático que puede ser mortal si no se detecta a tiempo o también requiere de un trasplante de hígado urgente según el estudio de Selinski *et al* ²⁴. Actualmente no existe biomarcador específico para el diagnóstico de IHIMA, es necesario varias pruebas bioquímicas, estudios genéticos que hacen posible su temprana detección.⁴⁰ Lamentablemente el control de la tuberculosis, los sistemas de prevención y control son escasos en Perú, por eso hay una alta incidencia y prevalencia. La administración de los fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) no cumple un tratamiento ordenado por parte del personal de salud, por ende, la mayoría de los pacientes abandonan el tratamiento. En este estudio sólo se incluyó a los participantes que estaban en tratamiento de primera línea. ³

Los parámetros bioquímicos analizados (ALT, fosfatasa alcalina y gammaglutamil- transferasa) tienden a aumentar, indicando alteraciones en la estructura de las células hepáticas o los conductos biliares según el estudio de García Ferrera ¹⁹. Siendo estos resultados compatibles con nuestro trabajo en

base a los criterios de DILIN ⁴¹. Por ejemplo, ALT tiene una media de 300.17 en los casos, mientras, 28.87 en los controles. También ocurre con la fosfatasa alcalina que tiene una media de 289.87 en los casos, en cambio los controles tienen 152.87; lo mismo que GGT que tiene una media de 279.4 en los casos y los controles 78.37 y finalmente la bilirrubina que tiene 1.83 en los casos y los controles 0.6. Esto comprueba el diagnóstico de la injuria hepática en base a los valores bioquímicos, según los criterios DILIN. Por tanto, es importante que los pacientes se sometan a controles bioquímicos regularmente para prevenir una hepatotoxicidad ^{47,48}.

La ALT es más específica que la AST para la lesión hepatocelular puesto que el aumento del AST, indica anomalías en el musculo, corazón o riñón ¹⁵. En nuestros resultados no obtuvimos datos de esta enzima por recomendación profesional.

Adicionalmente, Tirapegui *et al* ⁴⁶, explican en su investigación que la hepatotoxicidad severa se produce con mayor frecuencia entre los 15 a 25 años con tratamiento antituberculoso de primera línea. Nuestro estudio afirma que el daño hepático ocurre con mayor frecuencia de 18 a 33 años. También Tirapegui, afirma que el aumento de la ALT ocurre en mayor frecuencia en personas de más de 60 años, siendo las mujeres un elevado grupo de riesgo debido a las reacciones tóxicas y alérgicas ^{46,48}. Sin embargo, nosotros tuvimos un 7% de personas mayores de 60 años que presentaron los síntomas de IHIMA y no hubo discrepancia entre hombres y mujeres de mayor edad.

En nuestro estudio, se analizó el fragmento de 1093pb del gen *NAT2* porque es polimórfico, muestra variabilidad genética, y siendo el responsable del control de la acetilación en las reacciones metabólicas del ser humano. A partir de esto, se definen los fenotipos acetiladores. En el trabajo se encontró polimorfismos con significancia clínica los cuales son: 481C>T (rs1799929), 590G>A (rs1799930), 857G>A (rs1799931), 341T>C (rs1801280), 282C>T (rs1041983) y 803G>A (rs1208) que viene a ser un 94.5%. El resto son variantes no conocidas (5.5%). Esta variabilidad genética podría ser causa para la condición de IHIMA ⁴⁰.

Estudios en la India indican una susceptibilidad a un alto riesgo de padecer daños en el pulmón, vejiga, cáncer de mama y colon por las variantes genéticas *NAT2* en población de diferentes regiones, según el estudio de Chauhan *et al.* ¹³

Gracias a la tecnología del secuenciamiento masivo NGS (Paneles personalizados – *custom* panel y secuenciamiento del exoma - Whole exome sequencing) se pudo obtener a gran escala la anotación de las variantes genéticas conocidas y nuevas *NAT2*, que consiste en etiquetar cada una de las variantes detectadas con su información biológica-funcional. Actualmente estos estudios brindan una gran cantidad de información ³⁹. Nuestro proyecto, empleó el NGS para el gen *NAT2*, encontrando variantes nuevas en la región codificante del exón 2, como c.227A>C (p.Tyr76Ser), c.69A>C (p.Thr23=), c.422A>G (p.Lys141Arg) y c.584A>G (p.Glu195Gly) que representa 0.2% del total. Sin embargo, todavía se desconoce un posible efecto en relación a IHIMA.

Se determinó la frecuencia de los genotipos del gen *NAT2* a partir de la frecuencia de los alelos comprobándose que las frecuencias de los genotipos en los tres SNPs, tanto en el grupo IHIMA como No IHIMA, se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos y alelos de los tres polimorfismos genéticos *NAT2* evaluados en los casos y controles.

Según Bao *et al.* ⁴⁰, hicieron varios estudios a nivel mundial sobre la identificación de los polimorfismos genéticos con respuesta a fármacos involucrados en la susceptibilidad de hepatotoxicidad inducida por medicamentos antituberculoso. Recopilando 38 estudios de metaanálisis con 2225 casos y 4906 controles, el fenotipo acetilador lento *NAT2* fue asociado significativamente con un alto riesgo a IHIMA ($p < 0.05$). Sin embargo, nuestro estudio resulto no significativo entre casos (n=30) y controles (n=30) con un $p = 0.7934$.

El estudio de Wattanapokayakit *et al.* ⁴⁸ en una población de Tailandia, concluye que el acetilador lento del gen *NAT2* es determinante para IHIMA. Esta

investigación muestra la asociación de los casos del fenotipo lento NAT2 71.1% con los controles 22.4% resultando un OR 8.80 (95% IC 4.01-19.31, $p= 1.53 \times 10^{-8}$) evidenciando un factor de alto riesgo, también contrastó el IA entre casos y controles, del cual obtuvo un OR 0.18 (95% IC 0.08-0.38, $p= 5.02 \times 10^{-6}$) indicando un factor protector para IHIMA. Al comparar con nuestros resultados, OR 1.14 (95% IC 0.41-3.2, $p=0.7934$), se observa que son diferentes, sin embargo es importante resaltar que el fenotipo acetilador lento NAT2, tiene una frecuencia media en ambos grupos IHIMA y No-IHIMA.

Las variantes genéticas del gen *NAT2* se encuentran distribuidas de manera diferencial en la mayoría de regiones del mundo. Europa y Asia presentan frecuencias diferentes respecto a los países sudamericanos. Europeos, africanos y la región noreste de Tailandia muestran una alta prevalencia el fenotipo lento NAT2, muy diferente a los chinos y japoneses que tienen una baja prevalencia ^{48,}
49.

En el Perú, nuestros datos confirmaron que existe mayor prevalencia de fenotipo acetilador lento NAT2 (43%) en pacientes con IHIMA. Debido a que la tendencia a desarrollar IHIMA tiene un componente genético, es posible identificar las mutaciones predisponentes antes de iniciar el tratamiento para así prevenir la reacción adversa que puede dañar irreversiblemente el hígado o causar la muerte.

Las limitantes de esta investigación es que se analizó tres polimorfismos principales. Sin embargo, se requiere mayor análisis con cuatro a seis polimorfismos, para determinar los haplotipos y consecuentemente los fenotipos para su comparación con las manifestaciones de IHIMA. Por consiguiente, nuestros resultados están circunscritos a las variantes evaluadas, todavía limitadas y deben ser sujetas a otros análisis. También incrementar el tamaño de muestra, podría ser un criterio a considerar.

Podríamos deducir que nuestro resultado no significativo, podría incluir el aumento del número de polimorfismos genéticos para obtener una combinación de 4 a 6

alelos para identificar el fenotipo acetilador NAT2. Otro, el estudio de otros genes con predisposición a IHIMA, donde existen variantes predisponentes y protectoras. Por tanto, todavía nuestros resultados no son concluyentes ⁹.

Finalmente, es importante seguir determinando las variantes predisponentes a injuria hepática en las poblaciones peruanas, debido al *background* genético en Lima que tiene un promedio de 70% de ancestría nativa peruana y casi 100% en las zonas rurales del interior ⁵⁰.

CONCLUSIONES

1. Los parámetros bioquímicos ALT, FA, Bilirrubina y GGT, permiten discriminar los grupos de casos y controles de acuerdo a los criterios considerados por el *Drug-Induced Liver Injury Network*, lo que valida la selección de los pacientes con TB que conforman cada grupo del estudio.
2. La aplicación de la tecnología de exoma completo permitió identificar cuatro nuevas mutaciones del gen *NAT2* en los pacientes con TB, distribuidas entre los casos y controles del estudio.
3. Los genotipos resultantes de los tres polimorfismos rs1799929, rs1799930 y rs1799931 que determinan el fenotipo acetilador en el gen *NAT2*, analizados de manera individual, no muestran asociación con la condición IHIMA.
4. No se encontraron diferencias significativas entre los alelos de los tres polimorfismos genéticos del gen *NAT2*, determinados en pacientes IHIMA y no-IHIMA.
5. Aunque no se identificó una asociación significativa entre los fenotipos acetiladores de las variantes genéticas del gen *NAT2* y las manifestaciones de IHIMA, existe una tendencia hacia la preponderancia del fenotipo acetilador lento *NAT2* en la muestra peruana en estudio.

RECOMENDACIONES

1. Incorporar un sistema de control rutinario, en base a los parámetros bioquímicos de las personas que inician su tratamiento antituberculoso, para identificar manifestaciones moleculares de injuria hepática.
2. Realizar investigaciones en este campo que incluyan un mayor número de pacientes y la evaluación de polimorfismos del gen *NAT2* adicionales a los considerados en esta investigación, además de evaluar otros genes.
3. Implementar el uso de técnicas de secuenciamiento masivo NGS (paneles personalizados o secuenciamiento del exoma) para obtener datos de nuevas variantes del gen *NAT2* y otros genes para evaluar su posible relevancia clínica como biomarcadores predictivos de injuria hepática en pacientes con TB.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. World Health Organization. Tuberculosis [Internet]. Geneva: WHO; 2017. [Citado el 08 de abril de 2018]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
2. Reyes J. Activación diferencial de células dentríticas murinas de origen mieloide con cepas de diferente virulencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). [Tesis de maestría]. México: Departamento de Inmunología, Instituto Politécnico Nacional; 2010.
3. Ministerio de Salud. Guía para el equipo de salud: Enfermedades Infecciosas, Diagnóstico de Tuberculosis. [Internet]. Segunda edición. Argentina. 2014. [Citado el 04 de marzo de 2018]. Recuperado a partir de: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000049cnt-guia_de_diagnóstico_tratamiento_y_prevencion_de_la_tuberculosis_2015.pdf
4. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017 [Internet]. Geneva: WHO; 2017. [Citado 19 de octubre de 2019]. Recuperado a partir de: https://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf?ua=1
5. Situación de control de la Tuberculosis en las Américas 2017 [Internet]. Organización Panamericana de la salud. Organización Mundial de la Salud. Oficina Regional para las Américas. [Citado 15 de abril de 2018]. Recuperado a partir de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=44088&Itemid=270&lang=en.
6. Alarcón V., Alarcón E., Figueroa C., Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2017; 34 (2): 299-310. doi: 10.17843/rpmesp.2017.342.2384
7. Lima de Figueiredo R., Quinhones Pires M., Suffys N. and Rezende A. Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art [Internet] Tuberculosis Bassam Mahboub, IntechOpen, 2013. doi: 10.5772/54984.
8. Selinski S., Blaszkewicz M., Ickstadt K., Hengstler J., Golka K. Refinement of the prediction of N-acetyltransferase 2 (NAT2) phenotypes with respect to enzyme

- activity and urinary bladder cancer risk. *ArchToxicol.* 2013; 87 (12): 2129-2139. doi: 10.1007/s00204-013-1157-7.
9. Xiang Y., Ma L., Wu W., Liu W., Li Y. et al. The incidence of liver injury in uyghur patients treated for TB in Xinjiang Uyghur autonomous region, China, and its association with hepatic enzyme polymorphisms NAT2, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1. *PLoS ONE.* 2014; 9 (1): e85905. doi:10.1371/journal.pone.0085905.
 10. García J. Polimorfismo NAT2 y patología humana. [Tesis doctoral]. España: Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura; 2001.
 11. Nebert D. Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to Ecogenetics, Pharmacogenetics and Molecular Epidemiology. *Pharmacogenetics.* 2000; 10: 279-290.
 12. Lafuente A. Polimorfismos genéticos: susceptibilidad para el desarrollo de cáncer y predicción en la respuesta al tratamiento. *Gastroenterol HepatolContin* 2004; 3 (1): 20-24.
 13. Chauhan N., Padh H. Variants of NAT2 polymorphisms: Intra and Inter ethnic differences. *African Journal of Biotechnology,* 2014; 13(51): 4639-4646. Doi.10.5897/AJB2013.13226.
 14. Fontana R., Watkins P., Bonkovsky H., Chalasani N., Davern T., Serrano J., et al. DILIN Study Group. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) prospec
 15. Fernando Caravaca-Fontána, Lilia Azevedo b, Miguel Ángel Bayo b, Boris Gonzales-Candiab, Enrique Lunab y Francisco Caravaca. Niveles séricos elevados de gamma-glutamil transferasa y fosfatasa alcalina son predictores independientes de mortalidad en la enfermedad renal crónica estadio 4-5. *Nefrologia* 2017; 37 (3): 267–275. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2016.11.010>
 16. Manuel García Martín¹, Amado Zurita Molina² Transaminasas: Valoración y significación clínica. ¹Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. [Citado el 25 de junio de 2019]. Recuperado a partir de: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>
 17. Center S. A. (2007). Interpretación de las enzimas hepáticas. En: *vetclinsmallanim* 37. Editorial El servier saunders. Pp 297-333.

18. Pérez, Georgina Rocío; Nasello, Walter; Murno, Graciela. Fosfatasa alcalina, su interpretación clínicopatológica. [Tesis de pregrado.] Facultad de Ciencias Veterinarias –UNCPBA. 2016
19. García Ferrera WO. ¿Cómo evaluar la elevación de las enzimas hepáticas en personas aparentemente sanas? Su importancia para el médico general. *Rev Gastroenterol Peru*. 2013; 33(3):262-4.
20. Análisis de bilirrubina. Mayo Clinic. [Citado el 25 de junio de 2019]. Recuperado a partir de: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/bilirubin/about/pac-20393041>
21. Arnold R., Plevoda B., Reilly J., Sherman F. The action of N-terminal acetyltransferases on yeast ribosomal proteins. *J Biol Chem*. 1999; 274 (52): 37035-37040. doi:10.1074/jbc.274.52.37035
22. Richardson M., Kirkham J., Dwan J., Sloan D., Davies G. y Jorgensen A. Influence of genetic variants on toxicity to anti-tubercular agents: a systematic review and meta-analysis (protocol). *Systematic Reviews*. 2017; 6: 142. Doi: 10.1186/s13643-017-0533-4.
23. Sotsuka T., Sasaki Y., Hirai S., Yamagishi F., Ueno K. Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients. *In Vivo*. 2011; 25 (5): 803-812.
24. Selinski S., Blaszkewicz M., Ickstadt K., Hengstler J., Golka K. Refinement of the prediction of N-acetyltransferase 2 (NAT2) phenotypes with respect to enzyme activity and urinary bladder cancer risk. *ArchToxicol*. 2013; 87 (12): 2129-2139. doi: 10.1007/s00204-013-1157-7.
25. Xiang Y., Ma L., Wu W., Liu W., Li Y. et al. The incidence of liver injury in Uyghur patients treated for TB in Xinjiang Uyghur autonomous region, China, and its association with hepatic enzyme polymorphisms NAT2, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1. *PLoS ONE*. 2014; 9 (1): e85905. doi:10.1371/journal.pone.0085905.
26. Salazar-Granara A., Youn-Ho K., Figueroa-Tataje J., Quijano F., Ore-Chávez D., Sandoval-Sandoval J. Frecuencia del polimorfismo 282 C>T del gen N-Acetiltransferasa (NAT2) en poblaciones peruanas e implicancias en la salud. *Horiz Med* 2016; 16 (1): 20-31.

27. Hernández-González O., Ortiz-Zamudio J., Rodríguez-Pinal C., Alvarado-Morales I., Martínez-Jiménez V., Salazar-González R., Correa-González L., Gómez R., Portales-Pérez D., Milan-Segovia R. Genetic polymorphisms of arylamine N-acetyltransferases 1 and 2 and the likelihood of developing pediatric acute lymphoblastic leukemia. *LeukLymphoma*. 2017; 7 (1): 1-8. doi: 10.1080/10428194.2017.1406090
28. Yuliwulandari R., Sachrowardi Q., Nishida N., Takasu M., Batubara L., Susmiarsih T., et al. Polymorphisms of promoter and coding regions of the arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene in the Indonesian population: proposal for a new nomenclature. *JHumGenet*. 2008; 53 (3): 201–209.
29. Susilowati R., Prayuni K., Razari I., Bahri S., Yuliwulandari R. High frequency of NAT2 slow acetylator alleles in the Malay population of Indonesia: an awareness to the anti-tuberculosis drug induced liver injury and cancer. *MedJ Indones*. 2017; 26: 7–13.
30. Yuliwulandari R., Wilujeng Susilowati R., Wicaksono B., Viyati K., Prayuni K., Razari I., Kristin E., Syafrizal, Subagyo, Sri Diana E., Setiawati S., Ariyani A., Mahasirimongkol S., Yanai H., Mushiroda T. y Tokunaga K. NAT2 variants are associated with drug-induced liver injury caused by anti-tuberculosis drugs in Indonesian patients with tuberculosis. *Journal of Human Genetics*. 2016; 1: 1–5. doi:10.1038/jhg.2016.10.
31. Mahmouda L., Ghozzi H., Kamoun A., Hakim A., Hachicha H., Hammamia S., Sahnoun Z., Zalila N., Makni H., Zeghal K. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Tunisian patients with tuberculosis. *Pathologie Biologie*. 2012; 60: 324–330. doi:10.1016/j.patbio.2011.07.001.
32. Chamorro J., Castagnino J., Musella R., Frias A., Aranda F., De Larrañaga G. The distribution of allelic and genotypic frequencies of N-Acetyltransferase-2 variants in an Argentine population. *JInfectDevCtries*. 2012; 6 (9): 671-674. doi: 10.3855/jidc.2111.
33. Arias I., Lecompte N., Visbal L., Curiel I., Hernández E., Garavito P., Silvera-Redondo C. NAT2 gene polymorphisms in three indigenous groups in the Colombian Caribbean Coast region. *Colomb Med*. 2014; 45 (4): 148-153.

34. Lorente J. Nuevas perspectivas en Paleopatología a través de la Genética. [Internet]. Medicina Legal. Madrid Director del Laboratorio de Identificación Genética. Granada. [Citado el 10 de junio de 2018]. Recuperado a partir de: http://www.uam.es/otros/sepal/actas/actas_files/trabajos/04_San%20Fernando/17%20Pon.11.pdf
35. Díaz N., Bárcena J., Fernández E., Galván A., Jorrín J., Peinado J., Meléndez-Valdés T., Túnez I. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. [Internet]. Universidad de Cordova. Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Argentina. [Citado el 10 de junio de 2018]. Recuperado a partir de: https://www.uco.es/dptos/bioquimicabiolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
36. Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad. 2013; 2 (2): 70-78.
37. Pérez De Castro A., Picó M. Marcadores basados en restricción e hibridación: RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms). [Internet]. Universidad Politécnica de Valencia. 2014. [Citado el 29 de mayo de 2018]. Recuperado a partir de: <http://hdl.handle.net/10251/38353>
38. Márquez L., Serrato A., Cerritos R. Secuenciación de fragmentos de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. [Internet]. México. [Citado el 4 de junio de 2018]. Recuperado a partir de: <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/710/secuenciacion.pdf>
39. Abulí A., Boada M., Rodríguez-Santiago B., Coroleu B., Veiga A., Armengol L., et al. NGS-Based Assay for the Identification of Individuals Carrying Recessive Genetic Mutations in Reproductive Medicine. Hum Mutat. 2016; 37 (6): 516–523.
40. Bao Y., Ma X., Rasmussen T. y Zhong X. Genetic Variations Associated with Anti-Tuberculosis Drug-Induced Liver Injury. Curr Pharmacol Rep 2018. <https://doi.org/10.1007/s40495-018-0131-8>
41. Fontana R., Watkins P., Bonkovsky H., Chalasani N., Davern T., Serrano J., et al. DILIN Study Group. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) prospective study: rationale, design and conduct. Drug Saf. 2009; 32: 55–68.

42. Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos elaborado por Instituto Nacional de Salud. [Internet]. 3a. ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2005 [Citado el 7 de junio de 2018]. Recuperado a partir de: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/18.pdf
43. Nebert D. Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to Ecogenetics, Pharmacogenetics and Molecular Epidemiology. *Pharmacogenetics*. 2000; 10: 279-290.
44. Statacorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP.
45. Devarbhavi H. Antituberculous drug-induced liver injury: current perspective. *TropGastroenterol*. 2011 Jul-Sep; 32(3):167-74.
46. Tirapegui F. y Peña C. Factores de riesgo asociados a reacción adversa hepática por fármacos de primera línea contra *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Chil Enferm Respir* 2018; 34: 62-69
47. Huang YS. Recent progress in genetic variation and risk of antituberculosis drug-induced liver injury. *J Chin Med Assoc*. 2014 Apr; 77(4):169-73. doi: 10.1016/j.jcma.2014.01.010.
48. Wattanapokayakit S., Mushiroda T., Yanai H., Wichukchinda N., Chuchottawon C., Nedsuwan S., Rojanawiwat A., Denjanta S., Kantima T., Wongyai J., Suwankesawong W., Rungapiromnan W., Kidkeukarun R., Bamrungram W., Chaiwong A., Suvichapanich S., Mahasirimongkol S. y Tokunaga K. NAT2 slow acetylator associated with anti-tuberculosis druginduced liver injury in Thai patients. *INT J TUBERC LUNG DIS* 20(10):1364–1369 <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.15.0310>.
49. Chan SL, Chua APG, Aminkeng F, Chee CBE, Jin S, Loh M, et al. Association and clinical utility of NAT2 in the prediction of isoniazid- induced liver injury in Singaporean patients. *PloS ONE* 2017 12(10): e0186200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186200>.
50. Sandoval J.R., Salazar A., Acosta-Conchucos O., Castillo-Herrera W., Fujita, R., Pena, S.D. J. and Santos F.R. (2013). Tracing the Genomic Ancestry of Peruvian. *Journal of Human Genetics* Jul 18, doi: 10.1038/jhg.2013.73.

ANEXOS

Anexo 1: Datos complementarios

Tabla 9. *Primers* sintetizados para el gen *NAT2*

Primers	Secuencia nucleotídica
<i>NAT2 F</i>	5'GGAACAAAATTGGACTTGG3'
<i>NAT2 R</i>	5'TCTAGCATGAATCACTCTGC3'

Secuencia genética del gen *NAT2* N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase) (8p22)

gaacttatgcatgtaaaggattcatgcagtagaaactaacaagaattactatgacagatactataacct
 tgtgttttacgtatttaaatacgttatacctataattagtcacacgaggaaatcaaatgctaaagtatgatgttttat
 gtttgttttcttgcttagGGGATC**ATGGACATTGAAGCATATTTTGAAAGAATTGGCTA**
TAAGAACTCTAGGAACAAATTGGACTTGGAAACATTAACTGACATTCTTGAG
 CACCAGATCCGGGCTGTTCCCTTTGAGAACCTTAACATGCATTGTGGGCAA
 GCCATGGAGTTGGGCTTAGAGGCTATTTTTGATCACATTGTAAGAAGAAAC**C**
GGGGTGGGTGGTGTCTCCAGGTCAACTTCTGACTGGGCTCTGACCA
 CAATCGGTTTT**CAGACCACAATGTTAGGAGGGTATTTTAC**ATCCCTCCAGT
 TAACAAATACAGCACTGGCATGGTTCACCTTCTCCTGCAGGTGACCA**TTGAC**
 GGCAGGAATTACATTGTC**G**ATGCTGGGTCTGGAAGCTCCTCC**CAGATGTGG**
CAGCCTCTAGAATTAATTTCTGGGAAGGATCAGCCTCAGGTGCCTTGCATTT
 TCTGCTTGACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTAC**CTGGACCAAATCAGGAGAG**
 AGCAGTATATTACAAACAAAGAATTTCTTAATTCTCATCTCCTGCCAAAGAA
 GAAACACCAAAAATATACTTATTTACGCTTGAACCTC**GAACAATTGAAGAT**
 TTTGAGTCTATGAATACATACCTGCAGACGTCTCCAACATCTTCATTTATAAC
 CACATCATTTTGTTCCTTGCAGACCC**CAGAAGGGGTTTACTGTTTGGTGGGC**
 TTCATCCTCACCTATAGAAAATTCAATTATAAAGACAATACAGATCTGGTCG
 AGTTTAAACTCTCACTGAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGCTGAG**GAAATATATT**
 TAAGATTTCTTGGGGAGAAATCTCGTGCCAAACCTGGT**GATGGATCCCTT**
ACTATTTAGAATAAGGAACAAAATAAACCCTTGTGTATGTATCACCCA**ACTCAC**
 TAATTATCAACTTATGTGCTATCAGATATCCTCTCTACCCTCACGTTATTTT**GAA**
 GAAAATCCTAAACATCAAATACTTTCATCCATAAAAATGTCAGCATT**TATTA**AAA
 AACAATAACTTTTTAAAGAAACATAAGGACACATTTTCAAATTAATAAAAATAAA
 GGCATTTTAAGGATGGCCTGTGATTATCTTGGGAAGCAGAGTGATT**CATGCTA**
 GAAAACATTTAATATTGATTTATTGTTGAATTC
 NON CODANT

Leyenda: MRNA CDS initiator and stop codon genomic and intronic adjacent
 sequences allelic variation

Tabla 10. Detalle de los valores numéricos del presente proyecto

Código	Condición, No IHIMA=0 IHIMA=1	Sexo, Femenino=0, Masculino=1	Edad	Transaminasa (alt)	Fosfatasa alcalina (fa)	Bilirrubina	Gamma glutamil transferasa (ggt)	rs1799929 (gen_481ct), CC=0, CT=1, TT=2	rs1799930 (gen_590ga), GG=0, GA=1, AA=2	rs1799931 (gen_857ga), GG=0, GA=1, AA=2	Fenotipo acetilador (fen_ac), SA=0, IA=1, RA=2
TB01	0	0	26	36	791	0.3	998	1	0	0	1
TB02	1	0	23	132	190	1.5	242	0	0	1	1
TB03	0	1	23	11	95	0.3	56	0	0	1	1
TB04	0	0	27	42	303	0.6	25	0	1	1	0
TB07	0	0	39	20	81	0.4	26	1	0	0	1
TB08	0	1	41	43	180	0.3	115	1	0	0	1
TB09	0	0	33	84	104	0.6	22	0	0	2	0
TB10	0	0	77	21	366	0.28	73	0	1	1	0
TB101	1	0	32	692	75	0.41	285	1	0	1	0
TB113	1	0	22	29	107	0.6	44	0	1	1	0
TB116	0	0	66	25	118	0.6	37	0	1	1	0
TB12	1	0	36	241	188	0.6	40	0	0	2	0
TB121	0	0	79	21	83	0.3	20	1	1	0	0
TB123	1	1	69	230	256	0.5	173	0	0	2	0
TB126	0	0	53	42	109	0.7	104	1	0	1	0
TB131	1	1	25	174	606	0.9	909	0	0	1	1
TB133	1	0	34	241	505	2.35	310	1	0	1	0
TB134	1	1	76	280	288	2.5	251	0	1	1	0
TB137	1	1	34	45	398	2.5	34	0	0	0	2
TB138	0	1	23	27	78	1.02	44	1	0	1	0
TB14	0	0	20	20	104	1	21	1	0	1	0
TB143	1	1	32	169	114	1	30	1	0	1	0
TB146	1	1	25	41	217	1.4	331	0	1	1	0
TB148	1	1	33	244	106	1.1	93	1	0	0	1
TB149	1	0	30	421	73	0.4	16	1	0	1	0
TB15	1	1	47	141	151	0.5	134	0	0	0	2
TB152	1	1	22	80	348	0.7	325	1	0	1	0
TB153	1	0	57	40	318	2.6	262	1	1	0	0
TB154	0	1	32	16	102	1.7	29	0	0	1	0
TB156	0	0	56	16	343	0.8	11	2	0	0	0
TB158	1	0	59	1780	373	9.5	515	0	0	1	1
TB159	1	1	64	70	566	0.5	278	0	0	1	1
TB160	1	1	31	49	293	3	84	1	0	0	1
TB161	1	1	34	67	907	1.2	1260	0	0	1	1
TB18	1	1	33	99	514	1.48	514	0	1	0	1
TB23	1	0	42	691	263	6.4	366	0	1	1	0
TB27	1	1	18	246	228	2.72	442	1	1	0	0
TB28	1	0	38	470	407	1.1	332	0	0	2	0
TB32	0	0	31	29	78	0.4	15	1	0	1	0
TB33	0	1	70	16	143	0.59	28	0	1	0	1
TB37	0	0	27	10	78	0.4	27	1	0	0	1
TB38	0	1	27	27	140	0.4	40	1	0	0	1
TB42	0	1	30	30	170	0.23	45	0	0	1	1
TB43	0	1	36	43	99	1	96	1	0	0	1
TB44	1	0	34	244	139	1.4	144	0	0	0	2
TB45	0	0	25	16	172	0.5	36	0	0	1	1
TB46	0	0	73	15	103	0.6	34	1	0	1	0
TB48	0	1	60	18	91	0.5	32	0	0	1	1
TB50	0	1	64	44	85	0.9	28	0	0	1	1
TB56	0	0	62	21	148	0.4	44	0	0	1	1
TB59	1	1	49	111	326	1.5	84	0	0	2	0
TB60	0	1	63	34	77	0.7	23	0	0	1	1
TB67	1	0	40	934	86	0.9	175	0	1	1	0
TB69	0	0	36	26	82	0.46	35	1	0	1	0
TB83	0	0	18	50	98	0.3	86	1	0	0	1
TB84	1	0	36	668	270	2.4	296	0	0	1	1
TB85	0	1	44	42	88	0.33	152	1	0	1	0
TB86	1	1	31	274	90	2.1	147	1	0	0	1
TB94	0	1	27	21	77	0.8	49	0	0	1	1
TB95	1	0	22	102	294	1.28	266	0	0	2	0

Anexo 2. Instrumentos de recolección de datos

- Nanodrop lite, espectrofotómetro, de marca Thermo Scientific, N° de serie 3723. Precisión de absorbancia con una medida de 1.0516, y una repetición de absorbancia (con medida de Std. Dev.) de 0.002.
- Proflex™ Base PCR systems 3x32, marca Applied Biosystems, N° de serie 297804898
- Analizador genético ABI-3500, marca Applied Biosystems, N° de serie 23133-241.
- Illumina (NGS), plataforma de secuenciación Miseq, longitud del Read (bp) 2x300, Base de datos de 15 GB.

Anexo 3: Consentimiento informado



La Molina, 21 de julio de 2015

Oficio No. 982 - 2015 - CIEI-USMP-CCM

Señor Doctor
Ricardo Miguel Fujita Alarcón
Director del Centro de Genética y Biología Molecular
Facultad de Medicina Humana - USMP
Presente

Ref. Proyecto: "Perfil Inmunogenómico y Farmacogenómico para Determinar la Predisposición a Hepatotoxicidad por Tratamiento Antibuculoso en Pacientes Peruanos."

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente en materia de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la sesión del 20 de julio evaluó y aprobó los siguientes documentos:

- Proyecto: "Perfil Inmunogenómico y Farmacogenómico para Determinar la Predisposición a Hepatotoxicidad por Tratamiento Antibuculoso en Pacientes Peruanos."
- Consentimiento Informado para el Paciente

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que correspondan.

Atentamente,


Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CadaM.

AVG/ABZ/ad
Adjunto (2) documentos sellados

La Molina, 22 de marzo de 2016

Oficio No. 334 - 2016 - CIEI-USMP-CCM

Señor Doctor
Ricardo Miguel Fujita Alarcón
Director del Centro de Genética y Biología Molecular
Facultad de Medicina Humana - USMP
Presente

Ref. Proyecto: "Perfil Inmunogenómico y Farmacogenómico para Determinar la Predisposición a Hepatotoxicidad por Tratamiento Antituberculoso en Pacientes Peruanos."

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente en materia de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la sesión del 21 de marzo evaluó y aprobó el siguiente documento:

- **Consentimiento Informado para el Paciente**

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que correspondan.

Atentamente,




Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CadsaMeir

AVG/ABZ/na
Adjunto (1) documentos sellados

La Molina, 10 de julio de 2018.

Oficio N° 491- 2018 – CIEI-FMH-USMP

Señora Blga.
Lina Laymito Chumbimuni
Alumna - Posgrado
Facultad de Medicina Humana de la USMP
Presente.-

Ref.: Proyecto de Investigación Titulado: "Relación de los fenotipos acetiladores del GEN NAT2 con la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos en pacientes peruanos. Universidad de San Martín de Porres 2016-2017"

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la sesión del **09 de julio** evaluó y aprobó el siguiente documento:

- **Proyecto de Investigación Titulado: "Relación de los fenotipos acetiladores del GEN NAT2 con la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos en pacientes peruanos. Universidad de San Martín de Porres 2016-2017"**

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que corresponda.

Atentamente,



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Facultad de Medicina Humana de la
Universidad de San Martín de Porres

AVG/ARZ/casf

Facultad de Medicina Humana
Alameda del Corregidor, N° 1517 Urb. Sirius
III Etapa - La Molina
Telf: 365-2300 / 365-2574 / 365-3640
365-0483 / 365-0485 / 365-0487
medicina@usmp.pe
www.medicina.usmp.edu.pe

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE

Título de la Investigación: Perfil Inmunogenómico y Farmacogenómico para Determinar la Predisposición a Hepatotoxicidad por Tratamiento Antituberculoso en Pacientes Peruanos

Estimado Señor(a):

La tuberculosis (TBC), requiere la aplicación de medicamentos por periodos prolongados, y a veces se reportan reacciones adversas a los medicamentos usados en el tratamiento inicial. El efecto adverso más conocido que afecta el hígado es la **injuria hepática inducida por medicamentos antituberculosos (IHIMA)**. Injuria que daña el hígado y es necesario un cambio de tratamiento. La injuria IHIMA tiene un componente genético que está ligado a la eficacia del metabolismo de los medicamentos y a la respuesta inmune anormal que puede producir inflamación del hígado. Nuevos estudios están descubriendo cómo las personas responden de manera diferente a los tratamientos y que hay variantes genéticas (que heredamos de nuestros padres) que hacen que alguien responda peor o mejor a un tratamiento. Estamos proponiendo un estudio científico para analizar si algunas de estas variantes genéticas influyen en la aparición o no de injuria IHIMA en pacientes peruanos.

¿Por qué se está haciendo esta investigación?

La identificación de las variantes que predispongan a injuria IHIMA podrá ser aplicada en su prevención y poder administrar el medicamento y la dosis adecuada en los pacientes. O sea se conocería de antemano que personas pueden recibir el medicamento estándar (isoniacida, rifampicina, etc.) y las que no pueden, cambiarles el tratamiento para evitar la injuria IHIMA. Este tipo de trabajo está siendo desarrollado en otros países y no se sabe cómo responderá la población peruana.

¿Cuál es el objetivo de la investigación?

Identificar las alteraciones genéticas que predisponen a injuria hepática inducida por medicamentos en pacientes peruanos. El estudio va a analizar 50 genes del metabolismo de medicamentos antituberculosos y 50 genes de inmunidad para establecer las diferencias entre personas que desarrollaron daño hepático (IHIMA) y las que responden bien a la terapia estándar.

Entrarán al estudio los participantes elegidos

- Pacientes diagnosticados con TBC por exámenes clínicos
- Pacientes en tratamiento que muestren signos de daño hepático (injuria IHIMA).
- Pacientes con terapia estándar que no muestren signos de daño hepático.
- Pacientes que firmen este consentimiento informado.
- Voluntarios como controles.

No participarán en el estudio

- Pacientes que no estén afectados por TBC
- Pacientes que no firmen el presente consentimiento informado.

¿En qué consiste su participación o la de su(s) hijo(s)?

Se le tomará a usted una muestra de sangre, que servirá para el examen de los genes en el estudio molecular. Se coordinará con el médico participante la toma de muestra y la firma del presente documento.

¿Cómo es la toma de muestra?

En una sola visita para la toma de sangre con anticoagulante EDTA, o si prefiere puede hacer sacar la muestra por una persona profesional de su confianza. La muestra extraída se coloca en un tubo con líquido para análisis y se rotula con un código anónimo para que no se conozca su identidad.



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidencia
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CardMSP



¿Qué tipo de exámenes se realizan?

Se incluirán pruebas de laboratorio para estudios genéticos usando el DNA de las muestras que es un método que permite analizar la herencia en las personas. Estos exámenes genéticos se realizarán primariamente en el Centro de Genética de Biología Molecular (CGBM) de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres y si fuera necesario, las muestras podrían ser enviadas a laboratorios que cuenten con tecnologías más eficientes para el diagnóstico genético.

¿Cuánto tiempo tomará participar en este estudio?

Solo requeriremos de la participación en una oportunidad para la toma de muestra de sangre que tomará aproximadamente 10 minutos. El análisis de laboratorio dura varios meses.

¿Qué desventajas existen de esta investigación?

No existe ninguna desventaja aparte del tiempo empleado en los exámenes, o sentir el pinchazo de la aguja, o un moretón que a veces ocurre cuando se saca muestra de sangre.

¿Quién conocerá el resultado y habrá acceso público a la información?

El trabajo genético está planificado para mantener el anonimato, o sea el paciente no podrá ser identificado por una persona fuera del proyecto. La información individual o conjunta del trabajo podrá ser usada en información pública o científica resguardando la identidad del paciente o su familia. En casos especiales el médico podrá comunicar los resultados al paciente que lo solicite o cuando sea beneficioso para el paciente.

¿Puedo retirarme del estudio?

Es posible que por los resultados usted decida no participar. Si, usted puede retirarse en cualquier momento del estudio, solo háganos saber su negativa a participar. Si Ud., por consideraciones personales o de cualquier índole desea retirarse, bastará con comunicarlo. No habrá ninguna modificación en su atención médica rutinaria y tratamiento.

¿Tendré que realizar algún pago por los exámenes y estudios?

No, Ud. no tendrá que realizar ningún tipo de pago.

¿Recibiré dinero por someterme a este estudio?

No se ha previsto pagos por participar en este estudio.

¿A quién puedo recurrir para preguntar acerca de una duda o queja?

Para cualquier duda usted puede comunicarse con :

Dr. Ricardo Fujita A., Director del Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (USMP), Av. Alameda del Corregidor 1531, Urb. Los Sirius, La Molina. Teléfono fijo 3652300-anx. 152, celular 997 954 985, correo electrónico rfujitaa@usmp.pe

Dr. Teodoro Oscanoa, Jefe de Medicina Interna, Hospital Almenara. Teléfono celular 942 620 967

En caso de mayor información puede hacerlo con el Dr. Amador Vargas, Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de San Martín de Porres-Clinica CadaMujer quien vigila que la ejecución del proyecto sea bajo las normas éticas establecidas en el Perú. Av. Alameda del Corregidor 1531, Urb. Los Sirius, La Molina. Teléfono fijo 365 0483 anx. 160. Correo electrónico etica_fmh@usmp.pe



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CadaMujer



Participación voluntaria

Su participación en el estudio será totalmente voluntaria y si Ud. decide no participar, no se verá afectado en ningún aspecto de su atención, ni en sus derechos como paciente. La única diferencia es que no se le realizará la entrevista y no se le tomará la muestra para los análisis que tienen que ver estrictamente con el estudio.

¿Es posible que mi muestra pueda ser utilizada para el análisis genético de otras enfermedades?

Su muestra será archivada en un lugar seguro dentro del laboratorio del Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la USMP, en condiciones de total confidencialidad y solo se utilizará para estudios que puedan seguir contribuyendo al progreso de la ciencia. De ninguna manera será utilizada para otros fines. El laboratorio se reserva el derecho de destruir la muestra después de un tiempo estimado como máximo de 20 años. Ud. no necesariamente tiene que aceptar que su muestra sea utilizada para otros estudios que no sean específicamente el actual. Por lo cual se le pide se sirva a autorizar el uso o no de su muestra de sangre para estudios futuros.

DECLARACIÓN DEL PACIENTE:

"He leído y entendido la información prestada y escrita en este documento. También afirmo que he tenido la oportunidad de hacer algunas preguntas y resolver algunas dudas. Por lo que acepto libre y voluntariamente participar en esta investigación"

Nombre del paciente:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Huella digital:	<input type="text"/>
Nombre y apellidos del testigo:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Lima ____ de ____ del ____	_____



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica Católica



ASÍ MISMO AUTORIZO A QUE SI FUERA CONVENIENTE MI SANGRE PUEDE SER UTILIZADA PARA EL ANALISIS DE OTRAS ENFERMEDADES HEREDITARIAS DIFERENTES DEL PRESENTE ESTUDIO

Nombre del paciente:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Huella digital:	<input type="checkbox"/>
Nombre y apellidos del testigo:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Lima ____ de ____ del ____	



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente

Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Oficina Central

