



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL**

**Asociación de la Farmacogenética y Variantes del gen *NRAMP1* con el Fracaso al
Tratamiento en Pacientes con Tuberculosis Pulmonar**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
YVAIN DE LOS ANGELES SALINAS DELGADO**

**DIRECTORES DE TESIS
DRA. MARTHA GUADALUPE SOSA MACIAS
DR. MIGUEL ANGEL REYES LOPEZ**

Victoria de Durango, Dgo., Junio 2015



SP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 10:00 horas del día 14 del mes de julio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Asociación de la farmacocinética y variantes del Gen NRAMP1 con el fracaso al tratamiento en
pacientes con tuberculosis pulmonar

Presentada por el alumno:

SALINAS

DELGADO

YVAÍN DE LOS ÁNGELES

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	1	0	2	2	3
---	---	---	---	---	---	---

3

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


DRA. MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS


DR. MIGUEL ÁNGEL REYES LÓPEZ


DR. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ


DR. GERARDO MARTÍNEZ AGUILAR


DR. JOSÉ ISMAEL ANTONIO LARES ASEF

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. JOSÉ ANTONIO ÁVILA REYES



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-13-BIS

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 5 de junio del 2013

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CII DIR Durango en su sesión ordinaria No. 5 celebrada el día 4 del mes de junio conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

SALINAS

DELGADO

YVAÍN DE LOS ÁNGELES

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	1	0	2	2	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Asociación de la farmacogenética y variantes del GEN NRAPM1 con el fracaso al tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías y Dr. Miguel Ángel Reyes López

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CII DIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

Aspirante

Dr. Miguel Ángel Reyes López

Presidente del Colegio

YVAÍN DE LOS A. SALINAS D.
M. en C. Yvain de los Angeles Salinas Delgado

Dr. José Antonio Avila Reyes



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
IPN



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **14** del mes de **Julio** del año **2015** la que suscribe **Yvaín de los Ángeles Salinas Delgado** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B110223**, adscrito al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías** y del **Dr. Miguel Ángel Reyes López** y cede los derechos del trabajo titulado **“Asociación de la farmacocinética y variantes del Gen NRAMP1 con el fracaso al tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones ivainsalinas@hotmail.com, sosa.martha@gmail.com y marevesl@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

YVAÍN DE LOS A. SALINAS D.
M. EN C. YVAÍN DE LOS ÁNGELES SALINAS DELGADO

**ESTA INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR DEL CIIDIR-IPN DURANGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA.
EN C. MARTHA GUADALUPE SOSA MACIAS Y EL DR. EN C. MIGUEL ÁNGEL
REYES LÓPEZ**

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE CUADROS.....	XVI
1.0- INTRODUCCIÓN.....	1
2.0.- ANTECEDENTES	3
2.1.- Epidemiología de Tuberculosis.	3
2.2.- TRATAMIENTO PARA TUBERCULOSIS.....	6
2.3.- FRACASO AL TRATAMIENTO ANTI-TUBERCULOSIS	9
2.4.- METABOLISMO DE FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSIS.....	10
2.5.- CYP2E1	13
2.6.- N-acetiltransferasa (NAT2)	15
2.7.- Glutación-S-transferasa (GST; GSTM y GSTT).....	17
2.8.- Xantina Deshidrogenasa (XDH).....	18
2.9.- Gen <i>NRAMP1/SLC11A1</i> y Tuberculosis.	20
3.0- JUSTIFICACIÓN.....	23
4.0.- OBJETIVOS	24
4.1.- Objetivo General.....	24
4.2.- Objetivos Específicos.....	24
5.0.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
5.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO.....	24
5.2.- POBLACIÓN DE ESTUDIO	24
5.3.- VARIABLES	25
5.4.- CRITERIOS DE PAREAMIENTO	25
5.5.- UNIVERSO MUESTRAL	25
5.6.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN	26
5.7.- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	27

5.8.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	27
5.9.- VARIABLES CONFUSORAS	27
5.10.- TAMAÑO DE LA MUESTRA	27
5.11.- LUGAR DE ESTUDIO	28
5.12.- ASPECTOS ÉTICOS.....	28
5.13.- PROCEDIMIENTOS	29
5.13.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO	29
5.13.2 REVISION DE EXPEDIENTE.....	29
5.14.- GENOTIPIFICACIÓN	29
5.14.1 EXTRACCIÓN DE DNA	29
5.14.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA.....	29
5.14.3 INTEGRIDAD DE DNA.....	29
5.14.4 PROCEDIMIENTO DE GENOTIPIFICACIÓN	30
5.14.5 DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO ACETILADOR INFERIDO A PARTIR DEL GENOTIPO DE <i>NAT2</i>	33
5.14.6 DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i> POR PCR MULTIPLEX	33
6.0.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
7.0.- RESULTADOS.....	37
7.1.- FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE LOS POLIMORFISMOS DE <i>NAT2</i>	38
7.2. FENOTIPO ACETILADOR INFERIDO DE LOS GENOTIPOS DE <i>NAT2</i>	39
7.3 FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE LOS POLIMORFISMOS DE <i>CYP2E1</i> , <i>XDH</i> , <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	41
7.4 FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE LOS POLIMORFISMOS DE <i>NRAMP1</i>	43
7.5. ASOCIACIÓN DE <i>NAT2</i> y <i>NRAMP1</i> CON FRACASO AL TRATAMIENTO.	44
7.6 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.....	45
8.0.- DISCUSIÓN	46
9.0.- CONCLUSIONES.....	50
10.- RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	51

11- ANEXOS	52
11.0- BIBLIOGRAFIA.....	63

GLOSARIO

Abandono: Interrupción del tratamiento contra la tuberculosis, durante 30 días o más.

Baciloscopía: Prueba bacteriológica donde se toma muestra de expectoración u otros líquidos corporales para identificar a la micobacteria causante de tuberculosis.

Biotransformación: Conjunto de procesos celulares por los que los xenobióticos son modificados químicamente para facilitar su eliminación. Término equivalente a metabolismo de xenobióticos.

Caso de tuberculosis: Persona en quien se establece el diagnóstico de tuberculosis y se clasifica en caso confirmado o caso no confirmado, por bacteriología o histopatología.

Caso nuevo: Enfermo en quien se establece el diagnóstico de tuberculosis por primera vez.

Cultivo negativo: Ausencia de colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes, después de nueve semanas de observación.

Cultivo positivo: Demostración de colonias con características del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Curación ó respuesta al tratamiento: Caso de tuberculosis en el que desaparecen los signos clínicos y tiene baciloscopia negativa en los dos últimos meses o cultivo negativo al final del tratamiento.

CYP450: Superfamilia de genes, que codifican para enzimas denominadas genéricamente citocromo P450 o más simplemente CYP450. Se trata de un conjunto de hemoproteínas con actividad catalítica capaz de modificar químicamente a los xenobióticos.

Desequilibrio de ligamento: Asociación de dos alelos en un loci ligado con más frecuencia de la que se espera por azar.

Detoxificación: Cuando el resultado de la biotransformación de un xenobiótico resulta en un metabolito menos tóxico (y menos reactivo).

Equilibrio de Hardy Weinberg: Establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe ninguna fuerza evolutiva como selección, migración, mutación y deriva genética.

Fármacos anti-tuberculosis ó anti-fímicos: Tratamiento de primera línea conformado por isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol.

Farmacorresistencia o Drogorresistencia: Concepto microbiológico en el cual un microorganismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, aislado en un enfermo, no es susceptible a la acción de uno o varios fármacos anti-tuberculosos.

Fracaso de tratamiento: Persistencia de bacilos en la expectoración o en otros especímenes al término de tratamiento confirmada por cultivo, o a quien después de un periodo de negativización, tiene baciloscopía positiva confirmada por cultivo.

Genotipificación: Procedimiento de laboratorio para identificar la información genética de un organismo o genotipo y poder diferenciarlo del resto.

Haplotipo: Es un conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos. Haplotipo se puede referir a una combinación de alelos o a un conjunto de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP's) que se encuentran en el mismo cromosoma.

Homocigoto silvestre: Portador de dos alelos silvestres.

Homocigoto mutado: Portador de dos alelos mutados uno de origen materno y el otro de origen paterno.

Heterocigoto: Portador de un alelo mutado y un alelo silvestre o bien portador de las dos versiones alternativas de un gen.

Polimorfismo: Es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Para que pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer en al menos el 1% de la población.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en Ingles).

Polimorfismo intrónico: Polimorfismo o variación alélica no encontrada en región codificante.

Sondas TaqMan: Sistema de sondas marcadas con fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoroforo en su extremo 3' y una molécula en el extremo 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés “quencher”); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener.

SNP no sinónimo: Polimorfismo de un solo nucleótido que genera un cambio en el aminoácido resultante.

Tinción Ziehl Neelsen: La tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR) es una técnica de tinción diferencial rápida y económica, usada para la identificación de microorganismos patógenos, como *M. tuberculosis*.

Término de tratamiento: Caso de tuberculosis que ha completado el esquema de tratamiento, han desaparecido los signos clínicos y no se realizó baciloscopia o cultivo al finalizar el tratamiento.

Tratamiento estrictamente supervisado (TAES): El que administra el personal de salud o personal comunitario capacitado por personal de salud, quien debe confirmar la ingesta y deglución del fármaco para garantizar el cumplimiento del tratamiento.

Tuberculosis: Enfermedad infecciosa, generalmente crónica, causada por el complejo *Mycobacterium* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*), que se transmite del enfermo al sujeto sano por inhalación de material infectante, ingestión de leche de vaca infectada por dicho complejo, contacto con personas enfermas bacilíferas o animales bovinos enfermos.

Tuberculosis multirresistente: Al tipo de fármacorresistencia en la cual un microorganismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* no es susceptible a la acción de isoniácida y rifampicina, administradas simultáneamente.

Xenobiótico: Se denomina a aquellos compuestos que son ajenos al metabolismo celular. Compuestos que, en definitiva, interaccionan con los seres vivos pero no

forman parte de su metabolismo. Bajo esta denominación se incluyen productos químicos, fármacos y productos naturales.

ABREVIACIONES

TB:	Tuberculosis
MTB:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TBL:	TB latente
TBPA:	TB pulmonar activa
R:	Rifampicina
H:	Isoniacida
Z:	Pirazinamida
E:	Etambutol
CYP450:	Citocromo p-450
NAT2:	N-acetiltransferasa 2
GST:	Glutación-S-transferasa
XDH:	Xantina Deshidrogenasa
<i>NRAMP1</i> :	Resistencia natural asociada a la proteína 1 del macrófago
CMTB:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
BAAR:	bacilos ácido alcohol resistentes
DT2:	Diabetes tipo 2
DR:	Drogorresistentes
BCG	Vacuna que protege contra la tuberculosis
DNA	Acido desoxirribunucleico
µg/mL	Microgramo por mililitro
OR	Razón de momios (siglas en inglés)
CI	Intervalo de confianza (siglas en inglés)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (siglas en inglés)
HWE	Equilibrio de Hardy Weinberg (siglas en inglés)
IMC	Índice de masa corporal
kg	Kilogramo
m ²	Metro cuadrado
HDL	Colesterol de alta densidad (siglas en inglés)

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
nm	Nanómetros
ng	Nanogramo
min	Minuto
RPM	Revoluciones por minuto
S	Segundo
pb	Pares de bases
χ^2	Chi-cuadrada
μM	Micrómetros
μL	Microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de casos de tuberculosis por regiones de México en el año 2013.....	5
Figura 2. Mapa de Distribución Geográfica de la incidencia de TB en todas sus formas. Casos 2013.	6
Figura 3. Esquemas de tratamiento para pacientes con tuberculosis.	7
Figura 4. Baciloscopía positiva en muestra de expectoración. <i>Tinción Ziehl Neelsen. Bacilo ácido alcohol resistente Mycobacterium tuberculosis (MTB)</i>	10
Figura 5. Enzimas de Fase I y Fase II que metabolizan fármacos.....	12
Figura 6. Metabolismo de isoniacida.	15
Figura 7. Reacciones de N-acetilación, O-acetilación y N, O-acetilación catalizadas por NAT2.	16
Figura 8. Estructura del gen <i>GSTM1</i>	18
Figura 9. Metabolismo de Pirazinamida.	19
Figura 10. Efectos de los polimorfismos de <i>NRAMP1</i> en la infección de MTB.....	20
Figura 11. Ubicación cromosomal del gen <i>NRAMP1</i> y sus polimorfismos.	21
Figura 12. Interpretación de fluorescencia con fluorocromo VIC y FAM en PCR-Tiempo Real StepOne™	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fármacos de primera línea para el tratamiento de TB, su acción, interacción y efectos adversos.	8
Cuadro 2. Anti-fímicos que inhiben o Inducen enzimas de biotransformación.....	13
Cuadro 3. Secuencia y número de ensayo de sondas TaqMan de cada polimorfismo.	31
Cuadro 4. Iniciadores de PCR para amplificación del gen <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	34
Cuadro 5. Condiciones de amplificación por PCR del gen <i>GSTM1</i>	34
Cuadro 6. Condiciones de amplificación por PCR del gen <i>GSTT1</i>	35
Cuadro 7. Total de pacientes caso y control por estado e institución de salud.	37
Cuadro 8. Características demográficas de los pacientes agrupados en casos y controles. .	38
Cuadro 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de <i>NAT2</i> en casos y controles.	39
Cuadro 10. Fenotipo acetilador inferido de los genotipos de <i>NAT2</i> en casos y controles.	40
Cuadro 11. Frecuencias alélicas y genotípicas de <i>CYP2E1*5</i> y alelos de <i>XDH</i> en casos y controles.	42
Cuadro 12. Frecuencias genotípicas de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en casos y controles.....	43
Cuadro 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de <i>NRAMP1</i> en casos y controles.	44
Cuadro 14. Asociación de haplotipos del gen <i>NRAMP1</i> con fracaso al tratamiento.....	45

ABSTRACT

It has been described that polymorphisms in the genes *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *XDH* affect the metabolism and increase the toxicity of drugs used in the treatment of pulmonary tuberculosis (PTB). On the other hand, SNPs in *NRAMP1* have been associated with susceptibility to develop TB. At present, it has not been described the association of the polymorphisms in genes responsible of metabolism of drugs and in *NRAMP1* with treatment failure of PTB. The aim was to determine whether polymorphisms in *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *XDH*, and *NRAMP1* are associated with treatment failure in patients with PTB. Thirty-three subjects with treatment failure were paired by age and body mass index, with 33 patients who successfully completed treatment and were considered cured. We assessed the SNPs *NAT2* [* 5 (341 T> C), * 6 (590 G> A) * 7 (857 G> A) and * 14 (191 G> A)], *CYP2E1* [* 5 (1293 G> C)], *GSTM1* (*0), *GSTT1* (*0); *XDH* [4599C> T, 1150C> G] and *NRAMP1* (D543N G>A, INT4 G>C) by Polymerase Chain Reaction Real time TaqMan® SNP Genotyping. In the logistic regression analysis, the SNPs *NAT2**5 (T>C) and D543N G>A were associated with treatment failure (OR 3.20; 95%CI 1.14-8.94, and OR 11.61, 95%CI 3.6-36.7, respectively). After adjusting by gender, this association remained significant in male for SNP D543N G>A [OR 11.09, 95%CI (3.46-35.51)]. In contrast, was observed a possible protector effect against treatment failure with the SNP *GSTT1**0 (OR 0.14, 95%CI 0.02-1.24). The results suggest that the SNP *NAT2**5 is associated with treatment failure in patients with PTB, in the same way as the allele A for SNP D543N G>A of *NRAMP1*. The last association was observed only in men. This finding should be confirmed in other populations.

Keywords: Pulmonary tuberculosis, treatment failure, pharmacogenetic and *NRAMP1*.

RESUMEN

Se ha descrito que polimorfismos en los genes *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* y *XDH* afectan el metabolismo e incrementan la toxicidad de los fármacos empleados en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar (TBP). Por otro lado, algunos SNPs en *NRAMP1* se han relacionado con susceptibilidad a desarrollar TB. Actualmente, no se ha descrito la asociación de los polimorfismos en genes encargados del metabolismo de fármacos y en *NRAMP1* con fracaso al tratamiento de TBP. El objetivo fue determinar la asociación entre SNPs en *NAT2*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *XDH*, y *NRAMP1* con el fracaso al tratamiento en pacientes con TBP. Treinta y tres sujetos con falla al tratamiento se parearon por edad e IMC con 33 pacientes que completaron el tratamiento y se consideraron curados. Se determinaron los SNPs en *NAT2* [*5 (341 T>C), *6(590 G>A) *7 (857 G>A) y *14 (191 G>A)], *CYP2E1* [*5 (-1293 G>C)], *GSTM1* (*0), *GSTT1*(*0); *XDH* [4599C>T, 1150C>G] y *NRAMP1* (D543N G>A, INT4 G>C) mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan®. El SNP *NAT2**5 (T>C) se asoció con falla al tratamiento [OR 3.20, IC95% (1.14-8.94) $p = 0.023$] al igual que *NRAMP1* (D543N G>A) [OR 11.61 IC95% (3.6-36.7) $p = <0.0001$]. Después de ajustar por género ésta asociación se mantiene solo en hombres para el SNP D543N G>A [OR 11.09, IC95% (3.46-35.51) $p = <0.0001$]. Por el contrario, con *GSTT1**0 se observó un posible efecto protector contra falla al tratamiento [OR 0.14 IC95% (0.02-1.24) $p = 0.036$]. Estos resultados sugieren una asociación de *NAT2**5 con falla al tratamiento en pacientes con TBP, de la misma forma que D543N G>A de *NRAMP1*, esta última asociación se observó solo en hombres. Estos resultados deben confirmarse en otras poblaciones.

Palabras clave: Tuberculosis pulmonar, fracaso al tratamiento, farmacogenética y *NRAMP1*.

1.0- INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y *M. bovis*, que ocasiona 1.5 millones de muertes al año en el mundo.¹ La presencia de VIH/SIDA, diabetes tipo 2 y enfermedades crónicas pulmonares son factores de riesgo para adquirir TB, mientras que la desnutrición, el hacinamiento, el abuso de alcohol, tabaco y drogas, aceleran la progresión de TB latente (TBL) a TB pulmonar activa (TBPA)².

En México en el año 2013 se notificaron oficialmente 10,273 casos de TBP, de los cuales 9,908 pacientes ingresaron al tratamiento. El éxito del tratamiento se presentó en el 85.5% de los pacientes, de los cuales el 75.2% (7448 casos) se curaron y el 10.3% (1020 casos) terminaron el tratamiento. El fracaso al tratamiento se presentó en el 1.6% de los pacientes (157 casos), mientras que el 4.6% (458 casos) abandonaron el tratamiento y el 8.3% murieron por tuberculosis o por otras causas.³ El tratamiento de TBP requiere de esquemas combinados, intensivos y de larga duración con fármacos de primera línea que se divide en dos esquemas. El primero consta de cuatro fármacos: Rifampicina (R), Isoniacida (H), Pirazinamida (Z) y Etambutol (E) como fase intensiva durante dos meses, seguido de cuatro meses con H y R como fase de sostén. El segundo esquema se aplica a pacientes con fracaso, abandono o recaída al tratamiento, tiene una duración de ocho meses y consta de una fase intensiva de dos meses con H, R, Z, E y Estreptomicina (S), un mes de H, R, Z y E y una fase de sostén de cinco meses más con H y R.⁴ El fracaso al tratamiento se define como la persistencia de bacilos en la expectoración u otros especímenes al término del tratamiento o a quien después de un periodo de negativización tiene baciloscopia positiva por cultivo. Los factores principales de un fracaso al tratamiento son el abandono, la duración prolongada, efectos adversos producto de la combinación de fármacos hepatotóxicos como H, R y Z, tratamiento previo y la falta de adherencia que favorecen la aparición de cepas farmacorresistentes^{5,6,7,8}.

Se ha descrito en pacientes con TB que los factores genéticos como la presencia de polimorfismos clínicamente importantes en los genes que codifican para las enzimas que metabolizan fármacos (CYP450, NAT2, GST), pueden determinar la respuesta de cada paciente al tratamiento⁹.

Los fármacos empleados en el tratamiento de TB son metabolizados por enzimas de metabolismo de fase I (Xantina Deshidrogenasa [XDH] y CYP2E1) y fase II (NAT2, GSTM1y GSTT1), las cuales son altamente polimórficas a nivel de sus expresiones fenotípica, genotípica o ambas^{10,11}; condicionando amplias variaciones en su farmacocinética y por ende algunos individuos no responden a las dosis usuales de fármacos o presentan toxicidad¹².

Muchos estudios han publicado los mecanismos de defensa de la micobacteria para sobrevivir a los antibióticos; entre estos se encuentran mutaciones en genes que codifican para proteínas consideradas blancos terapéuticos^{13,14}. Así, se han identificado mutaciones asociadas al desarrollo de resistencia que conduce al fracaso en el tratamiento^{15,16,17}.

Entre los genes involucrados en la inmunidad innata y control de la infección por MTB se ha descrito al gen *NRAMP1* (resistencia natural asociada a la proteína 1 del macrófago) o también conocido como *SLC11A1* [solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), Member 1 por sus siglas en ingles]. Se han descrito algunos polimorfismos en *NRAMP1* (*INT4*, *D543N*) como posibles predictores de la gravedad de la enfermedad, en pacientes con TB. Estos polimorfismos se asociaron con la susceptibilidad a infectarse por micobacterias potencialmente infecciosas y con el desarrollo de farmacorresistencia por *M. tuberculosis*^{18,19,20}.

En este estudio se determinó la asociación de los polimorfismos en los genes *NAT2* [*5 (341 T>C), *6(590 G>A) *7 (857 G>A) y *14 (191 G>A)], *CYP2E1* [*3 (10023 G>A) y *5 (1293 G>C)], *GSTM1* (*1,*0), *GSTT1*(*1,*0); *XDH* [4599C>T, 1150C>G] y *NRAMP1* (*D543N* G>A, *INT4* G>C) con fracaso al tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar.

2.0.- ANTECEDENTES

2.1.- Epidemiología de Tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa provocada por bacterias que pertenecen al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) y por miembros del Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (CMA) en sujetos inmunodeprimidos²¹. La forma más común de tuberculosis es la pulmonar, sin embargo es capaz de afectar otros órganos y tejidos. Es un bacilo que se caracteriza por ser ácido-alcohol resistente y de crecimiento lento. La tuberculosis pulmonar (TBP) es la forma más común de la enfermedad, se presenta en más del 80% de los casos y es la principal forma infecciosa²². La infección por el bacilo tuberculoso ocurre por la confluencia de factores exógenos tales como contacto con un paciente enfermo, el grado de proximidad con el mismo, duración del contacto y el ambiente donde se produce el contacto. La transmisión del bacilo se produce casi exclusivamente de persona a persona por vía aerógena. En teoría, una sola gota infectante, conteniendo un bacilo tuberculoso es suficiente para producir la infección, pero en la práctica, se requiere una exposición prolongada y numerosas gotas infectantes para que se produzca el contagio²³. Esta afirmación se sustenta en estudios realizados en contactos donde se demostró que pacientes con TBP, cuya expectoración posee bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) visibles con el microscopio (más de 100 BAAR/mL de expectoración), son los principales transmisores de la infección y pueden infectar hasta un 50% de sus contactos. Por el contrario, los pacientes con baciloscopia negativa, a pesar de cultivo positivo pueden transmitir la micobacteria a aproximadamente un 5% de sus contactos¹. Actualmente se considera que cada paciente bacilífero puede en un año transmitir el agente causal a aproximadamente 20 contactos²⁴. Anualmente se registran 4.1 millones de casos bacilíferos nuevos²². Se calcula que un tercio de la población mundial está infectada por MTB y solo el 90% de estos individuos desarrollarán tuberculosis latente (TBL). Aproximadamente del 5 al 10% (200 millones en el mundo) de estos individuos progresarán a tuberculosis pulmonar activa (TBPA) en alguna etapa de su vida². Los factores que

se asocian con la adquisición de la infección, desarrollo de la enfermedad y su mortalidad son muy complejos, abarcan aspectos sociales, económicos, biológicos y médicos. Entre los más relevantes están la presencia de VIH/SIDA, Diabetes tipo 2 (DT2), enfermedades crónicas pulmonares, desnutrición, hacinamiento, abuso de alcohol, tabaco y drogas, que aceleran la progresión de TBL a TBPA²⁵. Del total de casos nuevos de TB reportados en el año 2013 en México, el 63.5% presentó una enfermedad asociada, entre ellas el VIH/SIDA (5.6%) y DT2 (20.9%), o asociado con desnutrición (11.6%), alcoholismo (5.0%), drogas y tabaco (1.0%)²⁶. Tanto la diabetes como la tuberculosis son enfermedades crónicas e importantes problemas de salud pública mundiales. La TB afecta predominantemente a los países en desarrollo, donde es una de las causas principales de muerte. Cerca de un tercio de los pacientes muere durante el primer año después del diagnóstico y la mitad durante los cinco primeros años^{27,28}. En la actualidad es considerada una de las enfermedades reemergentes más importantes y es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo. En el año 2013, 9 millones de personas se enfermaron de TB (incidencia 139/100 000 habitantes) y 1.5 millones murieron por esta causa²⁹, agravándose por el aumento de cepas drogorresistentes (DR). De acuerdo con la información del componente de tuberculosis del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en México se mantiene una tendencia ascendente en la incidencia de mortalidad por TB. Cada año se detectan alrededor de 15 mil nuevos casos de TBP y cerca de 2 mil defunciones por esta causa, esto representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de nuestro país, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años³⁰. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en nuestro país la TB ocupa el primer lugar como causa de muerte por enfermedades infecciosas debidas a un solo agente etiológico³¹, el cual afecta principalmente a los hombres en el 60% de los casos, cifra que aumentó en el año 2011 a 70%³². En cuanto a la edad, el grupo con mayor número de casos es de 65 años o más³³.

En el estado de Durango de enero a septiembre del año 2013 se notificaron oficialmente 79 casos de TBP. Entre los estados con mayor incidencia está el estado de Veracruz, en donde se registraron 1264 casos de nuevo diagnóstico en ese mismo año¹ (Figura 1). Sin embargo, la existencia de subregistros de la enfermedad en nuestro país, la carencia de infraestructura de laboratorios, las fallas en la detección primaria de los casos de TB y la falta bases de datos confiables en cada estado permiten establecer una incidencia exacta.

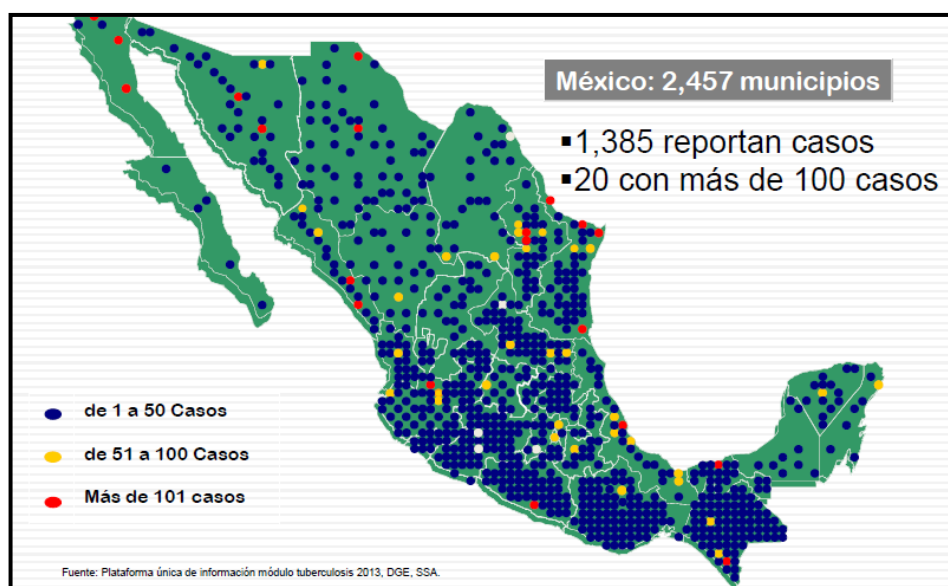


Figura 1. Incidencia de casos de tuberculosis por regiones de México en el año 2013

Actualmente, Durango ocupa el lugar número veintiuno del total de casos diagnosticados por TB en todas sus formas en nuestro país. Sin embargo, se ubica en el centro de los estados que presentan un constante movimiento bidireccional y una mayor incidencia de casos de TB por cada 100 mil habitantes (Sinaloa 29.9, Nayarit 24.7, Chihuahua 19.1 y Coahuila 21.1). Por lo tanto es evidente que las cifras del número de personas con tuberculosis en Durango puede ser más de la reportada por los sistemas de salud. Por otro lado, Veracruz ocupa el sexto lugar de los estados con mayor número de casos de tuberculosis en nuestro país con una incidencia de 26.7/100 mil habitantes, por arriba de la media nacional (16.6/100 mil

habitantes). Veracruz colinda con el estado de Tamaulipas que ocupa el tercer lugar nacional con una incidencia de 32/100 mil habitantes (Figura 2). Se estima que para el año 2020 cerca de mil millones de personas en el mundo contraerán la infección, doscientos millones de personas enfermarán y el número de muertes aumentará como mínimo a 35 millones³⁴.

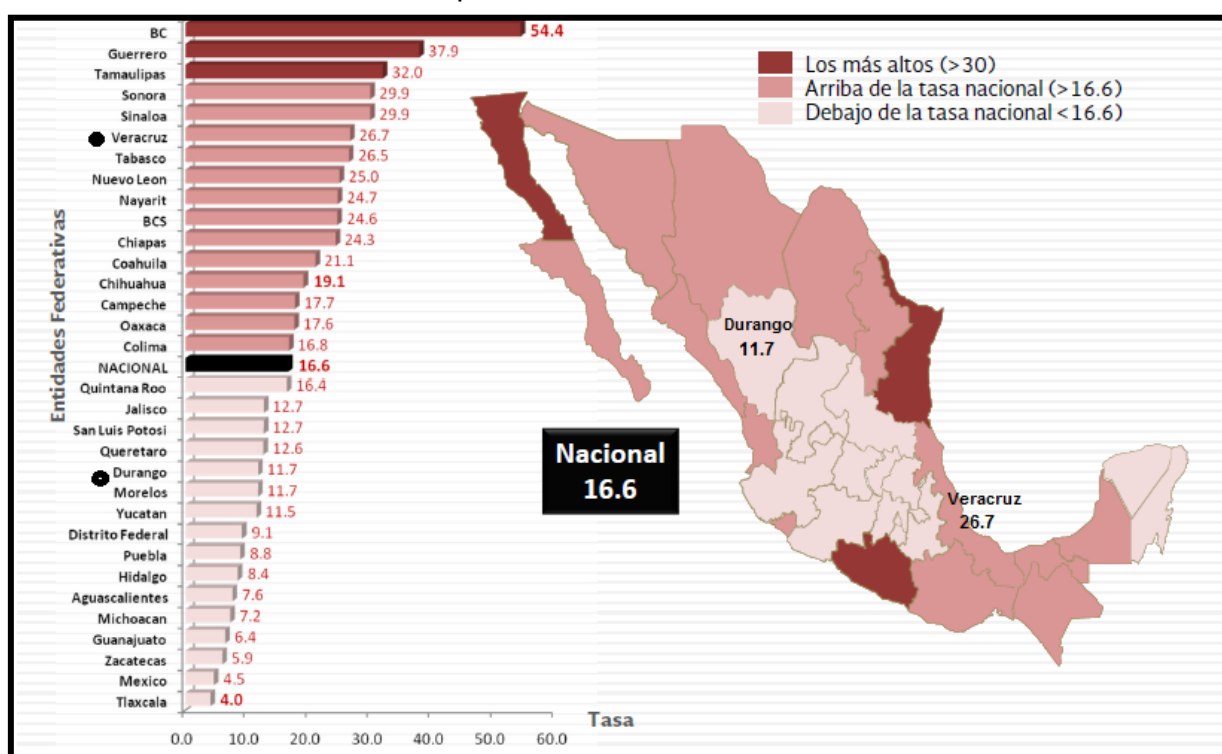


Figura 2. Mapa de Distribución Geográfica de la incidencia de TB en todas sus formas. Casos 2013. Fuente: Secretaria de Salud, DGE. Anuarios de morbilidad.Cierre2013. <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/TByDSSMexicoCursoTB2014.pdf>

2.2.- TRATAMIENTO PARA TUBERCULOSIS

En México, los esquemas terapéuticos que se utilizan para la tuberculosis se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993). El objetivo del tratamiento es obtener la rápida conversión bacteriológica de la expectoración u otra muestra biológica para cortar la cadena de transmisión, curar al paciente, evitar recaídas, fracaso al tratamiento y la selección de cepas de MTB drogorresistentes (MTB-DR). Para lograr lo anterior, el tratamiento debe ser intensivo, combinado,

prolongado y estrictamente supervisado⁵. Los fármacos que se aplican para el tratamiento de pacientes con tuberculosis son isoniacida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) y estreptomicina (S). Estos son considerados fármacos de primera línea en función de su efectividad y tolerabilidad, sin embargo, son altamente hepatotóxicos^{35,36} (Figura 3).

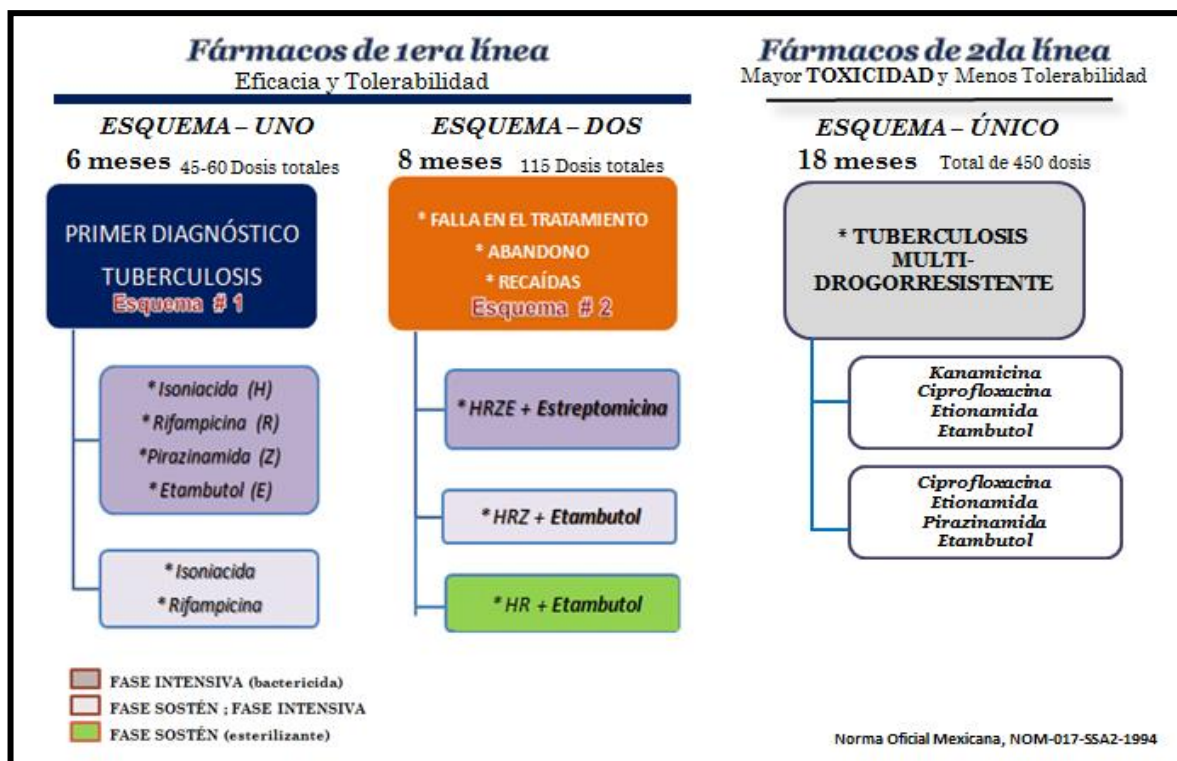


Figura 3. Esquemas de tratamiento para pacientes con tuberculosis.

Los fármacos de segunda línea se aplican en función de la presencia de reacciones adversas y drogorresistencias hasta por un periodo de 24 meses. El esquema de tratamiento está conformado por kanamicina (Ka), amikacina (Ak), capreomicina (Cp), rifabutina (Rb), rifapentina (Rp), ácido para aminosalicílico (PAS), etionamida (Et), protionamida (Pt), cicloserina (Cs), terizidona (Tz), ciprofloxacina (Cipro), ofloxacina (Of), levofloxacina (Levo) y moxifloxacina (Moxi). Los efectos adversos son más intensos a diferencia de los fármacos de primera línea y, por consiguiente, es más difícil mantener la adherencia del paciente al tratamiento. La hepatotoxicidad

es el principal efecto adverso en el paciente con TB, que puede ser fatal si no se detecta a tiempo, y es causada por H, R y Z,^{12,37}. Otros efectos adversos que pueden presentarse por el consumo de éstos fármacos son hipersensibilidad, desórdenes gastrointestinales y neurológicos (Cuadro 1). El control de las reacciones adversas en los pacientes con TB genera un costo adicional de la enfermedad³⁸. Por tal motivo H, R y Z fueron de mayor interés en éste estudio por los efectos adversos que producen en los pacientes y sus interacciones farmacológicas, las cuales se describirán más adelante.

Cuadro 1. Fármacos de primera línea para el tratamiento de TB, su acción, interacción y efectos adversos.

Fármacos Acción	Dosis Diaria / Vía	Dosis 3 / semana	Interacciones y efectos adversos
Isoniacida (H) Bactericida extra e intracelular	15 mg/Kg hasta 300mg Oral	20 mg/Kg hasta 600 mg	Fenitoína Neuritis Hepatitis Hipersensibilidad Sx lupoide
Rifampicina (R) Bactericida todas poblaciones Esterilizante	15 mg/kg hasta 600 Oral	20 mg/kg 600 a 900 mg	Inhibe anticonceptivos orales Quinidina Hepatitis Reacción febril Púrpura Hipersensibilidad Intolerancia oral
Pirazinamida (Z) Bactericida intracelular Esterilizante	25-40 mg/kg hasta 2 g	Hasta 50 mg/kg En >51 Kg hasta 2.5 g	Hiperuricemia Hepatitis Vómitos Artralgias Hipersensibilidad cutánea
Etambutol (E) Bacteriostático extra e intracelular	15-30* mg/kg hasta 1.2 g como dosis tope	40 mg/kg hasta 1.2 g como dosis tope	Neuritis óptica Discriminación rojo-verde
Estreptomina (S) Bactericida extracelular	15-30 mg/kg hasta 1 g	25-30 mg/kg hasta 1 g	Bloqueo neuromuscular Lesión VIII par Hipersensibilidad nefrotoxicidad

2.3.- FRACASO AL TRATAMIENTO ANTI-TUBERCULOSIS

El fracaso al tratamiento se define como el resultado de una baciloscopía positiva en la expectoración u otros especímenes al término del tratamiento, o en quien después de cinco meses de tratamiento y un resultado negativo la baciloscopía es positiva por cultivo (Figura 4). Las causas principales de fracaso al tratamiento son la falta de adherencia al mismo, el antecedente de tratamiento previo y la drogoresistencia^{7,8,39}. El control de la TB es especialmente difícil en nuestro país debido a la falta de infraestructura necesaria para un diagnóstico temprano, a la ineficiencia en las medidas de control de la transmisión, a terapias inadecuadas, al incumplimiento del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) y al retraso en la aplicación del tratamiento, en pacientes que contribuyen en la aparición de cepas MTB-DR.⁴⁰

A mayor tiempo invertido para su detección menor son las posibilidades de proporcionar un tratamiento adecuado al paciente y el riesgo de diseminación de la enfermedad aumenta. El fracaso al tratamiento anti-tuberculosis estandarizado es un problema grave que enfrentan algunos programas nacionales de control de la enfermedad. Se ha descrito un incremento en la frecuencia de fracaso al tratamiento en países con una tasa elevada de resistencia a isoniácida, con una alta proporción de casos que desarrollaron resistencia durante el tratamiento³⁷. Cuando se presenta un fracaso al tratamiento suele inferirse que la causa de su desarrollo es la presencia de cepas drogoresistentes, sin embargo en el año 1997 se describió un estudio donde se enfatiza que no en todos los pacientes que fracasan al tratamiento se debe a la presencia de una cepa drogoresistente⁴¹. *Espinal* observó que el 48% de los pacientes con TB nunca antes tratados portadores de cepas multidrogoresistentes no fracasaron al tratamiento⁴². En un reciente reporte se mencionó que los pacientes con fracaso al tratamiento y con historia previa de tuberculosis recayeron en menor tiempo que los pacientes control que se curaron ($p=0.01$), además, presentaron un riesgo seis veces mayor de recaer por el tratamiento previo ($p=0.008$)^{43,44,45,46}. Un factor de riesgo que influye en la eficacia de un tratamiento anti-tuberculosis son los polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de fármacos, los cuales pueden ser responsables en gran medida de la variabilidad en la respuesta a

fármacos. Estos polimorfismos causan alteraciones funcionales en las enzimas y dan lugar a diferentes fenotipos, desde metabolizadores lentos hasta metabolizadores ultrarápidos⁴⁷. Por lo tanto la determinación de factores genéticos puede ser importante marcador para garantizar el éxito del tratamiento⁴⁸.

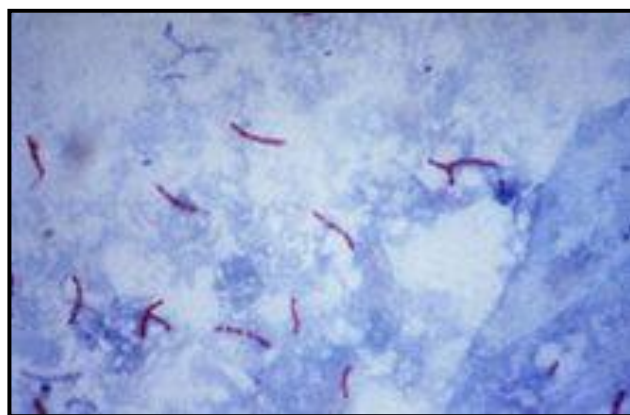


Figura 4. Baciloscopia positiva en muestra de expectoración. *Tinción Ziehl Neelsen. Bacilo ácido alcohol resistente Mycobacterium tuberculosis (MTB)*

2.4.- METABOLISMO DE FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSIS

En un paciente con TB a medida que aumenta el número de fármacos en su tratamiento, aumentan las posibles interacciones farmacológicas, con consecuencias clínicamente importantes como la inhibición del efecto terapéutico y reacciones adversas. Una interacción farmacológica se define como la interferencia en la eficacia o el perfil de seguridad de fármacos administrados simultáneamente⁴⁹. Estas interacciones pueden producirse en cualquier momento de la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de un fármaco. Para llevar a cabo el metabolismo de un fármaco, existen en el organismo humano gran variedad de enzimas con una amplia especificidad de sustratos. De la misma manera un mismo fármaco puede ser metabolizado por varias enzimas, aunque siempre habrá una ruta metabólica principal para cada fármaco⁵⁰. El proceso de biotransformación se divide en etapas o fases (Figura 5). En la Fase I se engloban procesos químicos de distinta naturaleza

(principalmente oxidación, oxigenación, reducción e hidrólisis, así como desalquilaciones y deshalogenaciones), cuyo resultado es la modificación química de las moléculas con la aparición de nuevos grupos funcionales⁵¹. El metabolito resultante es más polar, en ocasiones más reactivo y sensiblemente menos lipofílico. Con frecuencia los metabolitos formados en la Fase I se unen covalentemente a moléculas endógenas de la célula tales como ácido glucorónico, glutatión, sulfato y aminoácidos, generando conjugados (Fase II)^{47,49}. Este proceso conlleva un considerable aumento de la hidrosolubilidad y por lo general, también una disminución de su actividad farmacológica y/o toxicológica. Ambos procesos facilitan la eliminación renal o biliar de los metabolitos, pero no necesariamente todos los fármacos sufren un proceso de Fase I seguido de otro de Fase II. El objetivo principal de las reacciones de biotransformación es modificar la hidrofobicidad de un compuesto de manera que se facilite su eliminación y en ocasiones tal objetivo se alcanza sólo con las reacciones de fase I, sólo de fase II o ambas. Las reacciones de fase I se producen generalmente por la familia de las enzimas del CYP450 presentes en su mayoría en el hígado, pero también las hay en intestino, pulmones, riñón, cerebro, placenta y piel. Las reacciones de fase II, aumentan más la polaridad de los fármacos al conjugarlos con grupos endógenos, mediante glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación y conjugación con aminoácidos. Las enzimas que caracterizan a esta fase son las N-acetiltransferasas (NAT 1 y 2), otras enzimas de fase II, son la Glutatión-S-transferasas (GST), UDP-glucuronosiltransferasas y Sulfotransferasas (ST)⁴⁷. En las reacciones de fase I y II, pueden producirse interacciones farmacológicas, en las que uno de los fármacos puede inducir, inhibir o simplemente ser un sustrato de estas reacciones. Cuando el fármaco inhibe una enzima, puede hacerlo de forma competitiva o no competitiva. La inhibición competitiva se produce cuando el metabolismo del fármaco desencadenante, impide que se metabolice el fármaco blanco. La inhibición no competitiva se produce cuando el fármaco desencadenante se une a la enzima sin ser metabolizado e impide que se metabolice el fármaco blanco. Estas interacciones se inician y desaparecen rápidamente.

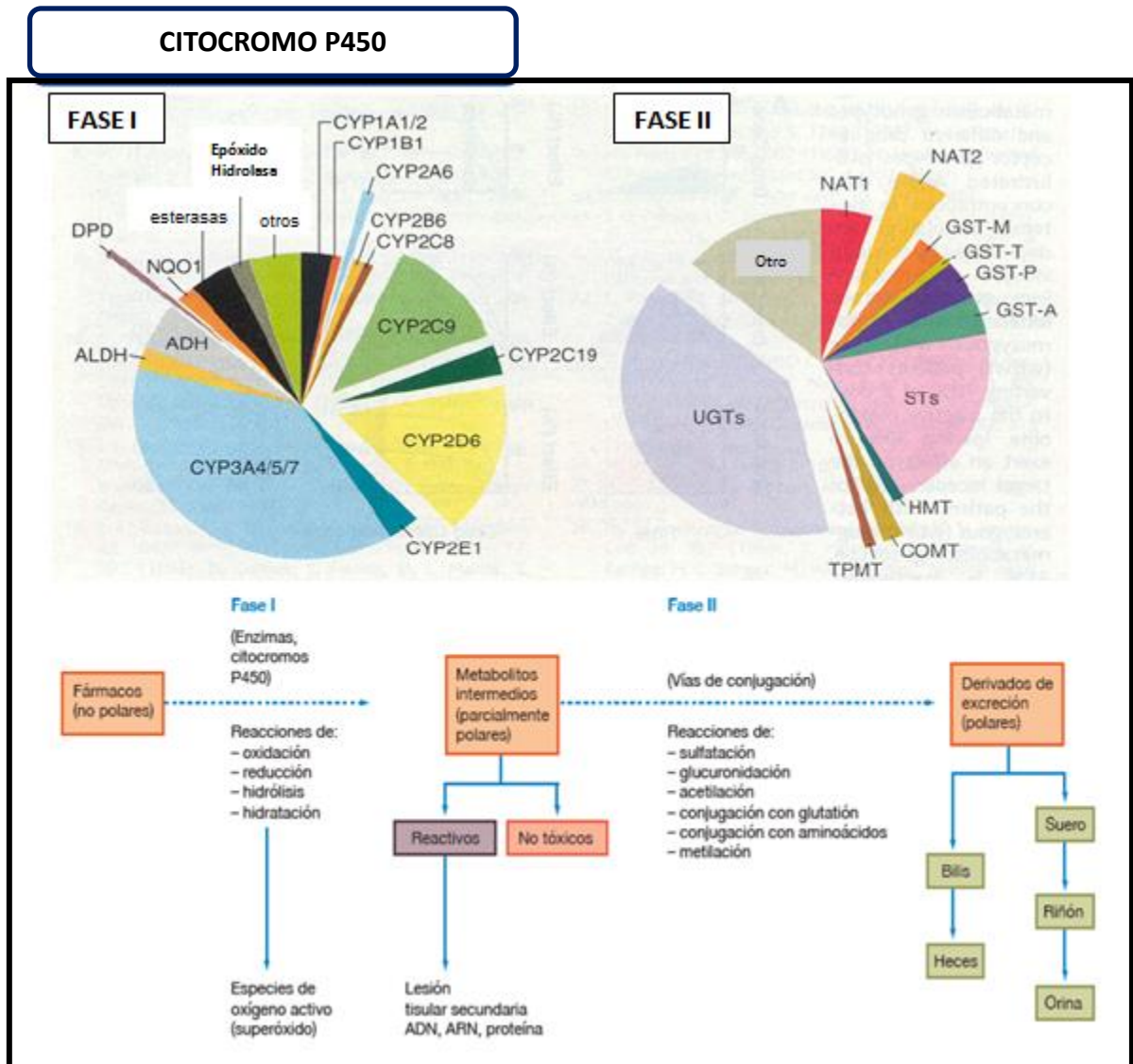


Figura 5. Enzimas de Fase I y Fase II que metabolizan fármacos. Las enzimas de Fase I son responsables de la adición de un grupo funcional en el sustrato original. Las enzimas de Fase II lo conjugan con agentes endógenos. La contribución de cada enzima en el metabolismo se estima por el tamaño relativo de cada sección de la gráfica.

En el caso de fármacos anti-tuberculosis como la isoniácida, éste inhibe de forma competitiva y no competitiva varias enzimas del CYP450, y por ende el metabolismo de sus fármacos blanco, aumentando sus concentraciones plasmáticas casi de inmediato. La inducción enzimática se produce cuando el fármaco desencadenante induce la síntesis de la enzima que metaboliza el fármaco blanco. La rifampicina es

un inductor enzimático clásico, y tiene efectos en el metabolismo de fase II (Cuadro 2). Cuando la rifampicina induce el metabolismo de los fármacos blanco, sus concentraciones disminuyen y el efecto completo puede no apreciarse hasta al cabo de dos semanas⁴⁹. La isoniácida, rifampicina y pirazinamida son fármacos potencialmente hepatotóxicos^{52,53}. En contraste, el etambutol tiene un perfil de interacciones limitado⁵⁴. Por tal motivo el conocimiento de estos efectos es relevante en la práctica clínica para conseguir en el paciente el efecto terapéutico deseado. Las enzimas encargadas del metabolismo de isoniácida y rifampicina son NAT2, CYP2E1, GSTM1 y GSTT1 (Figura 6). Mientras que en el metabolismo de pirazinamida participa la enzima Xantina Deshidrogenasa (XDH) (Figura 7).

Cuadro 2. Anti-fímicos que inhiben o Inducen enzimas de biotransformación.

Obtenido de: Manjunath P (2006), Alma Tostmann (2010), Virginia Leiro, (2008), Stefan Oswald, (2011), Wing Way (2006), Alma Tostmann (2008), Sang-Heon Kim (2011), *Vidyasagar (2013)

FÁRMACO	ENZIMA que lo metaboliza	FASE	INHIBE ACTIVIDAD	INDUCE ACTIVIDAD
ISONIACIDA (H)	NAT2 CYP2E1	II y I	CYP3A4 CYPC19 CYP2C9 CYP1A2 CYP2A6 CYP2E1* (Hepatotoxicidad)	*
RIFAMPICINA (R)	GSTM1 GSTT1	II	*	UDP- glucuronosiltransferasa, Sulfaniltransferasas Enzimas del CYP450 CYP2E1*
PIRAZINAMIDA (Z)	Xantina deshidrogenasa (XDH)	II	CYP2E1 CYP3A4	Sin reportes

2.5.- CYP2E1

El CYP2E1 es una enzima de 496 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de proteínas del citocromo P-450 (CYP450). Se han identificado más de 70 sustratos

metabolizados por esta enzima entre los cuales se encuentran alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, solventes halogenados y algunos fármacos como isoniácida, acetaminofén y cafeína^{55,56,57}. Esta enzima participa en la generación de hidrazina, un metabolito tóxico que se genera del metabolismo de isoniácida (Figura 6). CYP2E1 se expresa en el hígado y es inducida por rifampicina, acetona, etanol, benceno y otros compuestos que son en su mayoría sustratos de CYP450⁵⁸. Cuantitativamente comprende aproximadamente el 7% de todas las isoformas del CYP450 en el hígado.

El gen que la codifica *CYP2E1* se encuentra en el cromosoma 10q24.3⁵⁹. Estructuralmente está formado por 9 exones y 8 intrones. El Comité de Nomenclatura del CYP450 humano del instituto Karolinska (<http://www.cypalleles.ki.se/index.htm>), ha descrito principalmente 13 variantes alélicas en el gen *CYP2E1* la mayoría localizadas en su región promotora y en regiones intrónicas. Una de las variantes alélicas principales es *CYP2E1*5B* o alelo c2 el cual presenta los SNPs -1293G>C y -1053C>T, que provocan un aumento de la actividad transcripcional y elevados niveles de proteína⁶⁰. Fukino *et al*, 2008 reportó que en individuos con genotipo c2/c2 las concentraciones de hidrazina fueron ligeramente mayores que en aquellos con genotipo c1/c2. El polimorfismo *CYP2E1*5B* es más frecuente en asiáticos (~30%)⁶¹ que en caucásicos (3-4%) y en afroamericanos (0.3-1%)⁶². En población mexicana se ha descrito con una frecuencia de 16-30%^{63,64}. Se han descrito otros polimorfismos de *CYP2E1* cuyo significado clínico no es claro, debido a que no se ha demostrado una asociación convincente de éstos con la actividad catalítica de la enzima.

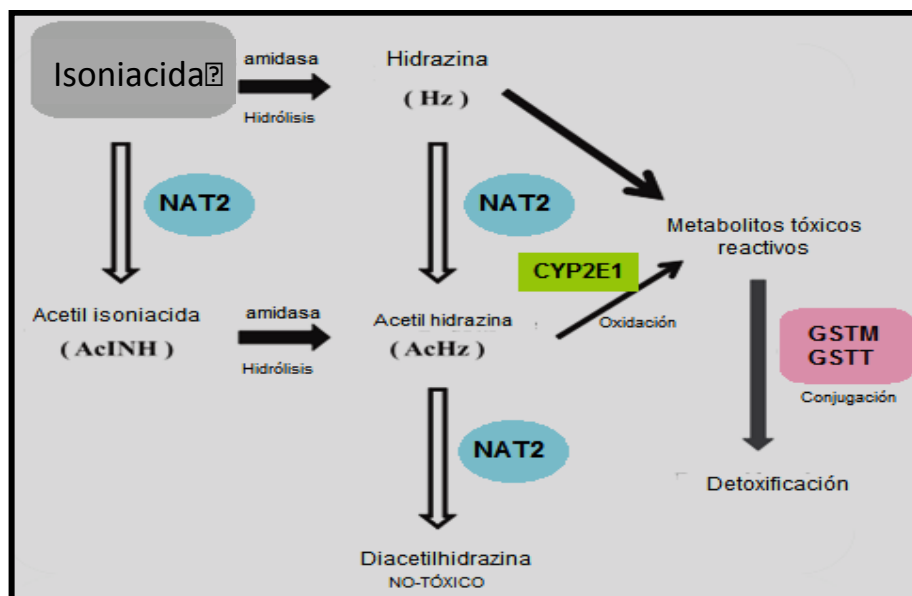


Figura 6. Metabolismo de isoniácida.

2.6.- N-acetiltransferasa (NAT2)

La enzima N-acetil-transferasa 2, también conocida como NAT2, es una enzima que se expresa en hígado e intestino^{65,66}. NAT2 cataliza reacciones de N-acetilación, O-acetilación y N,O-acetilación, al vincular Acetil-CoA a sustratos como arilaminas, arilhidrilaminas y arilhidrazinas (Figura 7). Muchos sustratos de NAT2 son compuestos antibacterianos entre los que se incluyen sulfonamidas, hidracina y el antifímico isonicida, el cual es metabolizado principalmente por NAT2⁶⁷. En la figura 6 se muestra el metabolismo de isoniácida, cuyo paso metabólico principal en su biotransformación al metabolito Acetil isoniácida (AcINH), catalizado por NAT2. La AcINH es hidrolizada por una amidasa y transformada en acetil hidracina (AcHz). Existe otra vía en la cual la isoniácida es hidrolizada por una amidasa en hidracina (figura 6). Es posible que NAT2, CYP2E1 y GST afecten la concentración plasmática de isoniácida e hidracina.

En humanos la enzima N-acetil-transferasa 2 es codificada por *NAT2*, un gen muy polimórfico ubicado en el locus 8p22 que consta de 2 exones. Se han descrito más de 36 alelos de *NAT2* en humanos⁶⁸, los cuales contienen entre 1 y 4 SNPs en la región codificante (www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html)⁶⁹.

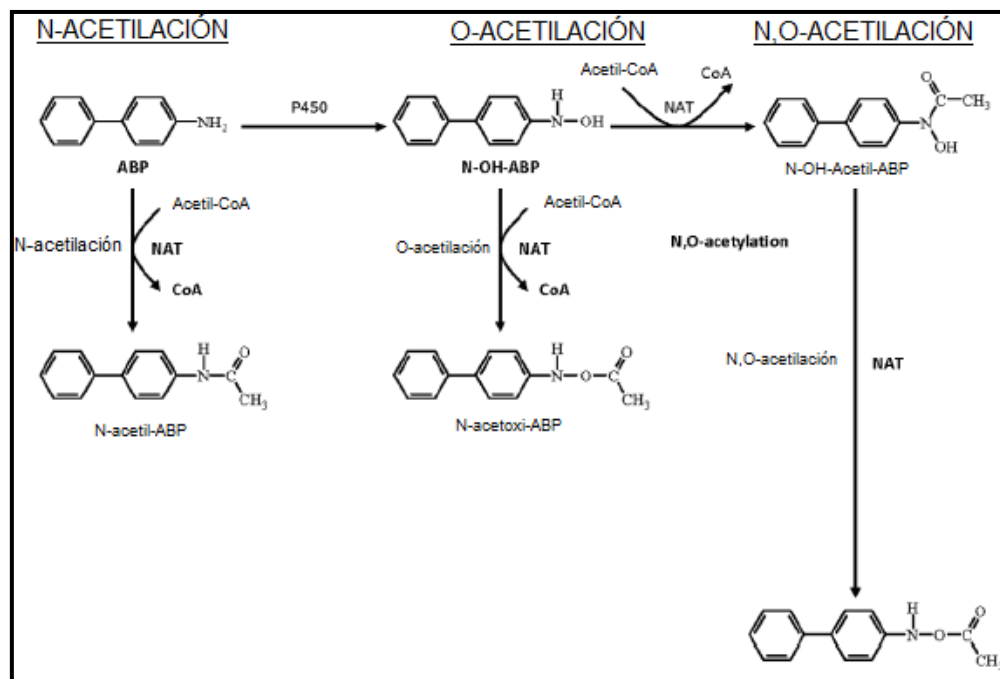


Figura 7. Reacciones de N-acetilación, O-acetilación y N, O-acetilación catalizadas por NAT2.

El alelo normal o silvestre, se denomina *NAT2**4. Los alelos *NAT2**5 (341T>C), *NAT2**6 (590G>A), *NAT2**7 (857G>A), *NAT2**14 (191G>A) y *NAT2**17 (434A>C), provocan una reducción en la actividad enzimática, alteran la afinidad por el sustrato y/o la estabilidad de la enzima^{70,71,72,73,74,75}. La combinación de los alelos determina el fenotipo acetilador; los individuos homocigotos para el alelo silvestre se han denominado acetiladores rápidos (AR), aquellos con genotipo heterocigoto con un alelo silvestre y uno mutado se han llamado acetiladores intermedios (AI), y los individuos homocigotos de alelos mutados se han designado acetiladores lentos (AL)^{76,77,78,79,80}. La frecuencia de los alelos en las diferentes poblaciones es variable, por lo que existen diferencias interétnicas en la capacidad acetiladora^{81,82}. El 95% de los AL corresponde a las variantes alélicas *5, *6 y *7^{83,84,85,86}. La prevalencia del fenotipo AL es del 50-70% en Caucásicos⁸⁷, 35-55% en los Afroamericanos y 10-30% en Asiáticos^{88,89}. Las poblaciones africanas y caucásicas tienen una alta frecuencia de los alelos *NAT2**5 (>28%) y una baja frecuencia del alelo *NAT2**7 (<5%)^{90,91}. Poco se sabe acerca de la prevalencia de variantes alélicas de *NAT2* en

la población de América Latina^{57,92,93}. *Díaz Molina et al., 2008* describió que los alelos prevalentes en población mexicana fueron NAT2*5, *6 y *4. La alta frecuencia del alelo NAT2*5 (34%) en mexicanos, el cual es poco frecuente en japoneses e indígenas de América Central, fue similar a la descrita en Caucásicos Americanos y Europeos (33-42%) (23-25, 33 *Díaz-Molina*). En otro estudio *Fukino et al., 2008*⁹⁴ realizó la evaluación del efecto de los polimorfismos de NAT2 sobre las concentraciones de isoniácida y sus metabolitos, en suero de pacientes con tuberculosis. El paso de acetilación de isoniácida a AcINH tiende a cambiar al paso hidrolítico que genera el metabolito hepatotóxico hidracina, cuando se incrementan los alelos mutantes de NAT2. Además, las concentraciones en suero de hidracina fueron significativamente mayores en AL que en AR de NAT2.

2.7.- Glutación-S-transferasa (GST; GSTM y GSTT)

La conjugación del agente endógeno glutatión sulfhidrilo (GSH) a sustratos endógenos o exógenos (ej.: fármacos) es catalizada por las enzimas citosólicas glutatión-S-transferasas (GST), las cuales juegan un papel importante en la detoxificación⁹⁵. Catalizan el ataque nucleofílico del glutatión sobre sustratos electrofílicos y con ello reducen la actividad de compuestos potencialmente tóxicos⁹⁶. Aunque en otros casos puede aumentar la toxicidad de los sustratos por ejemplo, de isotiocianatos de bencilo y fenilo, y de dihaluros de alquilo⁹⁷. Otros de sus sustratos son los productos del estrés oxidativo, óxidos de arenos, acetaldehídos, diálidos de alquilo, fármacos de uso clínico, pesticidas y toxinas ambientales^{98,99}. Las enzimas GST conocidas hasta ahora pertenecen a 8 clases distintas designadas como alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta¹⁰⁰. Los genes de la clase mu de GST se localizan en la región cromosómica 1p13.3, los de la clase theta en el cromosoma 22q11.2^{101,102} y al igual que los de clase mu son altamente polimórficos¹⁰³. Se ha identificado la delección homocigota de los genes *GSTM1* y *GSTT1* (designada como *0) que se asocia con la pérdida de actividad enzimática^{104, 105, 106, 107}. Diferentes autores mencionan que el polimorfismo *GSTM1**0 se genera por un proceso de

recombinación homóloga entre regiones repetidas en *GSTM1* y un gen que carece de éste alelo (*Bolt HM et al., 2006, Xu S et al., 1998, Parl FF et al., 2005*) (Figura 8). El polimorfismo *GSTM1* nulo es frecuente en humanos, de forma que se encuentra presente en aproximadamente un 50% de la población, con un rango de 30-70% para los distintos grupos étnicos (*Bolt HM, 2006*). Pocos estudios describen una asociación significativa de los genotipos nulos de *GSTM1* y *GSTT1* con el desarrollo de hepatotoxicidad por antifímicos.¹⁰⁸ *Virginia Leiro et al., 2008* publicó una asociación del genotipo *GSTT1*0* con el desarrollo de hepatotoxicidad causado por fármacos anti-tuberculosis en población caucásica. Este mismo efecto fue observado en pacientes con tuberculosis pulmonar activa de la India con el genotipo nulo en *GSTM1* y *GSTT1*.¹⁰⁹ Por otro lado, se ha descrito que pacientes bajo tratamiento con isoniácida con genotipo *GSTM1*0* tienden a acumular hidracina (*Fukino 2008*).

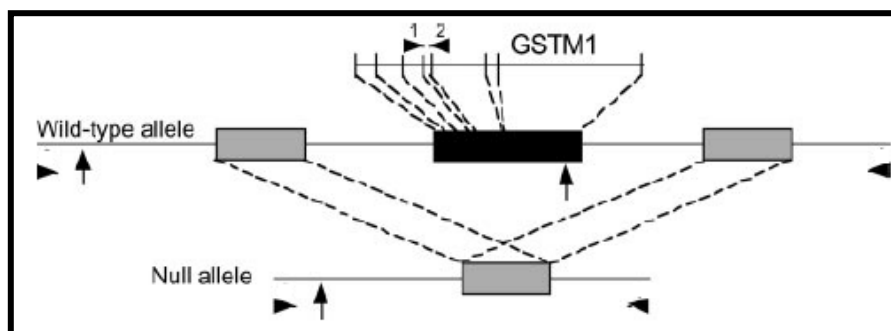


Figura 8. Estructura del gen *GSTM1*. El alelo nulo de *GSTM1* se origina por recombinação homóloga entre una región que carece del gen *GSTM1*, con regiones repetidas de 4.2 kb mostradas en cuadros grises en el gen silvestre, el resultado es una delección de 16 kb del gen completo.

2.8.- Xantina Deshidrogenasa (XDH)

Es una enzima comúnmente conocida como Xantina Oxidasa (XO) que es clave en la degradación de purinas. Cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y la oxidación de ésta última a ácido úrico, y contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno. La enzima XDH es responsable del metabolismo del anti-fímico pirazinamida (PZA)^{110,111}.

El ácido pirazinoico (PA) es el principal metabolito activo de PZA, producido por una amidasa microsomal hepática, el cual es un inhibidor activo de *Mycobacterium tuberculosis*. La enzima XDH hidroxila el PA y es convertido en ácido 5-hidroxipirazinoico (5-OH-PA)^{112,113,114} (Figura 9). En orina se han detectado los metabolitos PA, 5-OH-PA y 5-OH-PZA y solo un 4% de la PZA se excreta sin ningún cambio.¹¹⁵ El factor limitante en el metabolismo de PZA es la actividad de la amidasa hepática, encargada de la formación de PA a partir de PZA y de 5-OH-PA a partir de 5-OH-PZA. En cambio la oxidación de PZA por la XDH ocurre rápidamente (formación de 5-OH-PZA y 5-OH-PA a partir de PA). El uso de PZA tiene desventajas debido a que está asociada con hepatotoxicidad e hiperuricemia, y su severidad es similar a la observada con isoniácida y rifampicina¹¹⁶. La enzima encargada del metabolismo de PZA es codificada por el gen *XDH*¹¹⁷ que se expresa en hígado y está ubicado en el cromosoma 2p23.1. Se han descrito 10 polimorfismos genéticos de sustitución no sinónima que funcionalmente afectan la actividad de XDH empleando como sustrato el agente endógeno xantina¹¹⁸, una de estas es la variante *XDH* 3528C>G, Pro1150Arg que provoca una proteína inactiva, el cual es un posible factor que desencadena efectos adversos asociados al metabolismo de 6-mercaptopurina en humanos. Otra polimorfismo relevante es 4599C>T localizado en la región 3' UTR con repercusión en el procesamiento del RNAm.

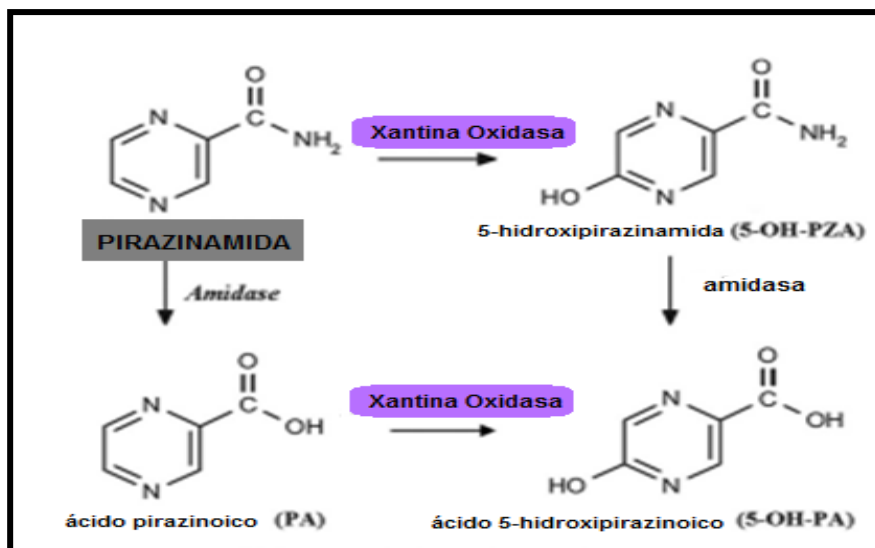


Figura 9. Metabolismo de Pirazinamida.

2.9.- Gen *NRAMP1/SLC11A1* y Tuberculosis.

Algunos estudios han descrito que la predisposición a desarrollar enfermedades infecciosas depende de la eficacia en la activación del sistema inmunológico determinado por factores genéticos¹¹⁹. Los macrófagos son la primera línea de defensa al inicio de la infección. Éstos se encargan de reconocer a *MTB* para fagocitarlo y eliminarlo mediante la función lisosomal, inducción de apoptosis y radicales libres¹²⁰. La concentración de Fe^{2+} puede restringir la replicación de patógenos intracelulares como *MTB*, mediante la alteración del medio ambiente fagolisosómico^{121,122,123,124} (Figura 10). La proteína encargada de bombear los cationes divalentes de Fe^{2+} a través de la membrana del fagolisosoma es NRAMP1 ("Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1")^{125,126}. Esta proteína de 550 aminoácidos es codificada por el gen *NRAMP1* o también nombrado *SLC11A1*, el cual consta de 14 kb de longitud y 16 exones, localizado en la región 2q35¹²⁷ (Figura 11).

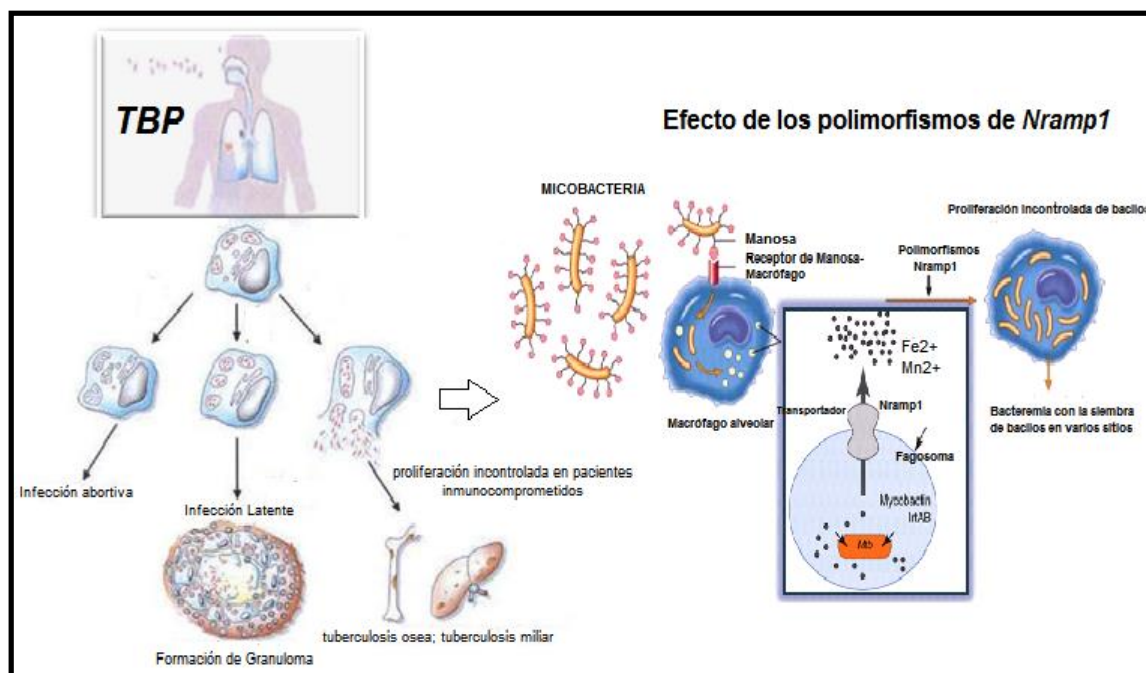


Figura 10. Efectos de los polimorfismos de *Nramp1* en la infección de MTB.

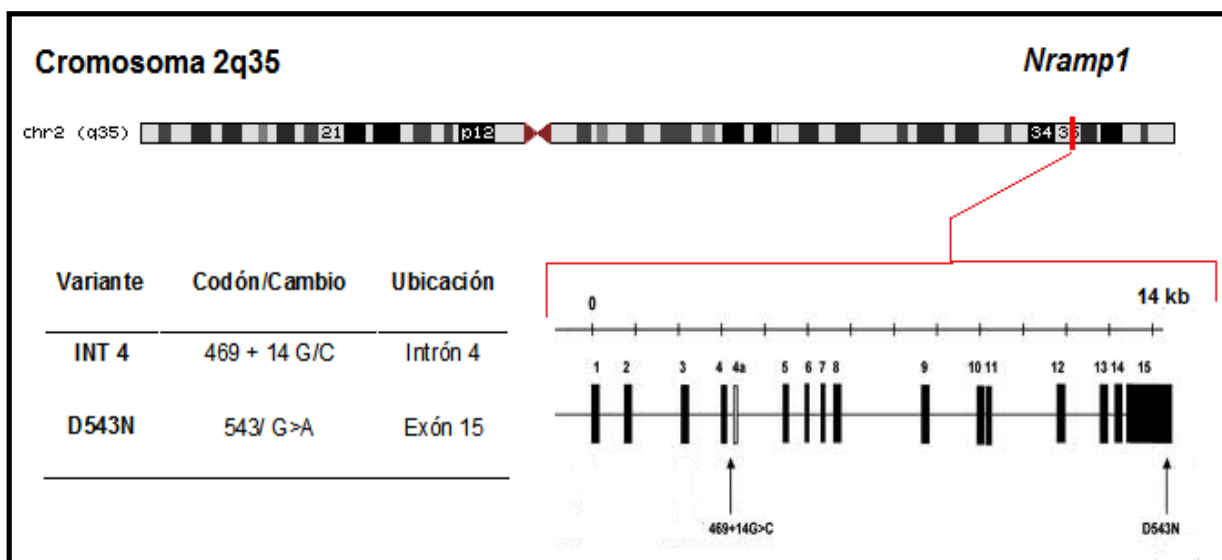


Figura 11. Ubicación cromosomal del gen *NRAMP1* y sus polimorfismos.

El gen *NRAMP1* se ha asociado con susceptibilidad a TB y con el control de la infección por *MTB* en población Asiática y Africana¹²⁹⁻¹³¹. Se ha descrito que en pacientes con TB los polimorfismos INT4 G>C y D543N G>A en *NRAMP1* podrían ser predictores de la gravedad, estar relacionados con la extensión clínica de la enfermedad y progresión a formas severas de TBP²³. A este respecto, *Soborg et al., 2002* reportó que las variantes alélicas del gen *NRAMP1* están asociados con el aumento de la replicación de micobacterias y que esto confiere susceptibilidad para desarrollar TB y formas severas de la enfermedad¹³⁴. Aunado a los polimorfismos de *NRAMP1*, el género y la edad son factores que pueden influir en dicha asociación^{128,129}. Un estudio realizado por *Ben Selma et al., (2012)*, describe la asociación del genotipo silvestre G/G de la variante D543N con la resistencia a desarrollar TBP en mujeres. Los polimorfismos en *NRAMP1* también se han asociado con mayor susceptibilidad a infectarse por micobacterias potencialmente infecciosas, y con el desarrollo de farmacoresistencia por *MTB*^{18,19,20,41}. Asimismo, se ha descrito que dichas variantes pueden afectar la respuesta al tratamiento.¹³⁰ En un estudio realizado en China, los SNPs INT4 G>C y D543N G>A de *NRAMP1* se

asociaron con dos formas clínicas graves de TBP bacilífera y TB cavitaria¹³¹. Por otra parte *Zhang W et al., (2005)* encontró asociación de los SNPs de *NRAMP1* con la progresión a la enfermedad pero no con susceptibilidad. Algunos estudios han demostrado que los polimorfismos en *NRAMP1* también influyen en la susceptibilidad a TB en población pediátrica^{132,133}. Por el contrario, existen estudios en otras poblaciones (Korea, Japón, Taiwan, Hong Kong, Brasil y Dinamarca) en los que los polimorfismos de *NRAMP1* no fueron un factor de riesgo para desarrollar TB^{134,135,136} ni se asociaron con severidad de la enfermedad¹³⁷. En México existe solo un reporte en el que se encontró que los polimorfismos 3'UTR y D543N no se asociaron con el riesgo a desarrollar TB¹³⁸. Sin embargo, el contraste de estos resultados puede atribuirse a factores como el estado clínico y el origen étnico de los pacientes^{139,131,140,141}.

3.0- JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es considerada una enfermedad re-emergente con mayor impacto en la salud pública y con una alta incidencia de morbi-mortalidad a nivel mundial. El fracaso terapéutico en pacientes con TB es una de las condiciones que mayor preocupación han generado en nuestro país el cual puede ser secundario a factores como la falta de adherencia o abandono al tratamiento, desarrollo de drogoresistencia y falta de respuesta a fármacos. Existe gran variabilidad interindividual en la respuesta a los medicamentos antifímicos de primera línea (rifampicina, isoniazina, pirazinamida y etambutol) que depende en gran parte de su metabolismo. En éste proceso participan diferentes enzimas (NAT2, CYP2E1, XDH, GSTT y GSTM) cuya actividad puede ser alterada debido a la presencia de polimorfismos en los genes que las codifican. Muchos de estos polimorfismos se han asociado principalmente con hepatotoxicidad en individuos bajo tratamiento con antifímicos, pero hasta la fecha no se ha evaluado su efecto sobre el fracaso al tratamiento. Otro factor que interviene en la respuesta al tratamiento antifímico se relaciona con genes inmuno-moduladores como *NRAMP1* que evita la propagación intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*. El gen *NRAMP1* se ha asociado con susceptibilidad, progresión y severidad de la TB, sin embargo no se ha analizado si las variaciones en este gen pueden influir en el fracaso al tratamiento.

Por lo tanto, en este estudio se evaluaron polimorfismos en genes encargados del metabolismo de antifímicos y en el gen *NRAMP1* con el fin de generar posibles marcadores moleculares de riesgo al fracaso al tratamiento, que contribuyan en el control de la TBP.

4.0.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo General

Determinar la asociación entre la Farmacogenética y las variantes del gen *NRAMP1* con el fracaso al tratamiento en pacientes con TBP.

4.2.- Objetivos Específicos

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *NAT2* [*5 (341 T>C), *6(590 G>A) *7 (857 G>A) y *14 (191 G>A)], *CYP2E1* [*5 (-1293 G>C)], *GSTM1* (*0), *GSTT1*(*0); *XDH* [4599C>T, 1150C>G] y *NRAMP1* (D543N G>A, INT4 G>C) en pacientes con TB.
2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de *NRAMP1* (D543N G>A, INT4 G>C) en pacientes con TB.
3. Determinar la asociación de los polimorfismos de *NAT2* [*5 (341 T>C), *6(590 G>A) *7 (857 G>A) y *14 (191 G>A)], *CYP2E1* [*5 (1293 G>C)], *GSTM1* (*1,*0), *GSTT1*(*1,*0); *XDH* [4599C>T, 1150C>G] y *NRAMP1* (D543N G>A, INT4 G>C) con el fracaso al tratamiento en pacientes con TB. .
4. Determinar la asociación de los polimorfismos *NRAMP1* (D543N G>A, INT4 G>C) con el fracaso al tratamiento en pacientes con TB.

5.0.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de casos y controles

5.2.- POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes con tuberculosis pulmonar con tratamiento farmacológico, y seguidos de forma prospectiva.

Definición de caso: Pacientes con diagnóstico nuevo de tuberculosis pulmonar con fracaso al tratamiento.

Definición de control: Pacientes curados de tuberculosis pulmonar que terminaron el tratamiento con éxito.

5.3.- VARIABLES

De los pacientes incluidos en el estudio se obtuvo información clínica y socio-demográfica mediante una encuesta, las variables evaluadas fueron las siguientes:

- **Diabetes tipo 2:** Enfermedad metabólica caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre.
- **Fumador:** Consumo diario durante el último mes o cualquier cantidad de cigarrillos, incluso uno.
- **Consumo de drogas:** Consumo intencional de sustancias no permitidas que alteran el sistema nervioso central.
- **Alcoholismo:** Consumo diario de bebidas alcohólicas.
- **BCG:** Vacuna que protege contra la tuberculosis.
- **COMBE:** Contacto previo con enfermos de tuberculosis.

5.4.- CRITERIOS DE PAREAMIENTO

- Edad
- Género
- Lugar de residencia
- Enfermedad concomitante

5.5.- UNIVERSO MUESTRAL

Pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar viviendo en el municipio de Durango y en el puerto de Veracruz que recibieron tratamiento para su enfermedad y fueron diagnosticados como curados o con fracaso al tratamiento.

Los pacientes considerados como curados completaron el esquema de tratamiento de primera línea de un periodo de seis meses con isoniacida, rifampicina y pirazinamida de acuerdo a la NOM-006-SSA2-1993. Además, tuvieron ausencia de síntomas y baciloscopías negativas por más de seis meses o un año después de

terminar su tratamiento. Los pacientes con fracaso al tratamiento fueron considerados aquellos que por primera vez se diagnosticaron con TBP e iniciaron tratamiento de primera línea y continuaron con bacilos en la expectoración al término del tratamiento ó que después de un periodo de negativización presentaban baciloscopía positiva. Del municipio de Durango se incluyeron pacientes de dos clínicas, del centro de salud No. 2 de la Secretaria de Salud y del IMSS de Durango. En el caso de Veracruz se recolectaron pacientes solo del puerto en siete clínicas de la Jurisdicción sanitaria VIII de la Secretaria de Salud y de tres unidades de medicina familiar (No. 57, 61 y 68) del IMSS, así como del consultorio No. 8 de la UMAE Hospital de Especialidades No. 14 C.M.N. "Lic. Adolfo Ruiz Cortines".

De acuerdo con datos de la Secretaría de Salud en México, hubo 19.738 nuevos casos de tuberculosis pulmonar en el año 2013. En los estados donde se realizó el estudio, alrededor de 1.300 sujetos de nuevo diagnostico recibieron tratamiento y cuarenta pacientes fracasaron al tratamiento. Por lo tanto el número de pacientes por grupo (n=33) incluídos en el periodo de estudio consideramos que es representativo de nuestra población.

5.6.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Hombres y Mujeres
- Mayores de 18 años de edad
- Pacientes con diagnóstico de TBP que terminaron el tratamiento primario acortado y se curaron
- Pacientes con diagnóstico de TBP con fracaso al tratamiento
- Residentes del estado de Durango
- Residentes del estado de Veracruz
- Con consentimiento informado firmado

5.7.- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes con VIH
- Pacientes con Hepatitis
- Mujeres embarazadas

5.8.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes que abandonaron el tratamiento
- Pacientes que retiraran su consentimiento
- Muestras de sangre o DNA que no fuera posible procesar por degradación

5.9.- VARIABLES CONFUSORAS

- Tratamientos concomitantes
- Enfermedades concomitantes
- Tiempo de evolución de la enfermedad

5.10.- TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de muestra se obtuvo mediante la fórmula para calcular el poder o potencia de la prueba mostrada a continuación:

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 p (1-p) / d^2$$

n = Tamaño de muestra

Z_{α} = Valor probabilístico de alfa 1.64 (nivel de significancia del 90%)

Z_{β} = Valor probabilístico de beta 0.842 Potencia (1- β) 0.80

p = Proporción esperada (0.5)

d = Diferencia máxima tolerada 0.20

$$N = [((1.64 + 0.842)^2 * (0.05 (1 - 0.05))) / (0.20)^2] = 38$$

El análisis de potencia de la prueba se utiliza para calcular el tamaño de la muestra necesario para detectar razonablemente un efecto¹⁴². Éste se expresa como $1-\beta$ y por lo regular un poder de 80 o 90%, dependiendo de las circunstancias, se considera suficiente, un valor para beta de 0.20 o 0.10. Mientras mayor sea el nivel de significancia (α) que se busca y mayor el poder que se desea de la prueba (β), más grande será el tamaño de la muestra¹⁴³.

Se incluyeron pacientes con diagnóstico previo o reciente de TBP que terminaron el tratamiento de primera línea con éxito y que fracasaron al tratamiento del año 2012 al 2013 en el estado de Durango y del año 2014 en el caso del puerto de Veracruz. El tamaño total de muestra obtenido fue de 66 pacientes los cuales fueron divididos en proporciones iguales por grupo de estudio.

5.11.- LUGAR DE ESTUDIO

El proceso experimental se realizó en el laboratorio de biología molecular de la central de instrumentación del CIIDIR-IPN Durango.

5.12.- ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio fue aprobado ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con el **No. R-2013-785-014** y por el comité local de investigación y ética del hospital general de Durango reconocido por la Secretaria de Salud con el número de oficio **308/012**. Así mismo fue registrado y aprobado por el comité de investigación y ética del hospital de alta especialidad de Veracruz con el número de oficio No. **SESVR/HRAEV/JEIC/JI/003/2014** y el registro **001/2014**.

5.13.- PROCEDIMIENTOS

5.13.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Todos los pacientes firmaron previo al estudio el consentimiento informado. ANEXO 1.

5.13.2 REVISION DE EXPEDIENTE

Se obtuvieron datos clínicos, epidemiológicos y socio-demográficos de los pacientes por expediente. ANEXO 2.

5.14.- GENOTIPIFICACIÓN

5.14.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante el uso de tubos vacutainer con el anticoagulante ácido etilen-diamino-tetra-acetato (EDTA). La extracción de DNA genómico se realizó mediante columnas de afinidad QIAmp DNA Blood Kit 90 (Qiagen, Hilden, Germany) a partir de 200 µL de sangre total mediante las especificaciones del Kit QIAGEN® (ANEXO 3). Cada muestra fue etiquetada según las características del laboratorio y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

5.14.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA

Una vez extraído el DNA se determinó su pureza y cuantificación en un espectrofotómetro tipo Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc®) con absorbancia de 260/280 nm. Un valor mayor a 1.8 se consideró como material genético libre de proteínas. Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 50 µg/mL de ADN doble hebra.

5.14.3 INTEGRIDAD DE DNA

La integridad y calidad de DNA genómico fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 40 min a 70 voltios. El gel de agarosa fue teñido con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. NOTA: Este es el más usado para teñir ácidos nucleicos. Desventajas: Es tóxico y necesita equipo de UV (también tóxico) y material

de seguridad. Ventajas: Potente y económico. A diferencia del SYBR Green que no necesita lámpara de UV, no se usa mucho para teñir ADN por su alto costo y se utiliza más en la PCR-cuantitativa. Su principal desventaja es que puede generar falsos positivos porque se une a secuencias inespecíficas

5.14.4 PROCEDIMIENTO DE GENOTIPIFICACIÓN

La determinación de los polimorfismos en *CYP2E1*, *NAT2*, *XDH* y *NRAMP1* se realizó por PCR en tiempo real en un equipo StepOne™ (Applied 94 Biosystems®) usando tecnología TaqMan. La Tabla 3 contiene la secuencia y número de ensayo de cada sonda TaqMan. Cada sonda está marcada con un fluorocromo específico para cada alelo (FAM ó VIC) que hibrida con la secuencia complementaria a la región de interés.

El proceso de amplificación de cada región se realizó en un volumen final de reacción de 10 µL totales consistiendo de la mezcla siguiente:

COMPONENTES	1X
Master Mix	3.3 µL
Sonda TaqMan	0.3 µL
DNA (10-15 µg/mL)	1.5 µL
Agua	4.9 µL
Total	10 µL

Cuadro 3. Secuencia y número de ensayo de sondas TaqMan de cada polimorfismo.

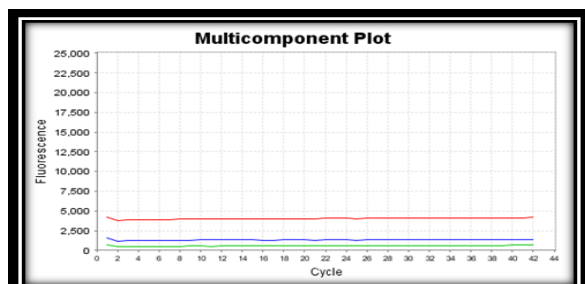
POLIMORFISMO	CAMBIO	Sonda TaqMan (VIC/FAM)	ID
NAT2*5 (rs1801280)	341 T>C	GTTACACCTTCTCCTGCAGGTGACCA[C/T]TGAC GGCAGGAATTACATTGTCGAT	C_1204093_20
NAT2*6 (rs1799930)	590 G>A	ATATACCTTATTTACGCTTGAACCTC[A/G]AACAA TTGAAGATTTTGAGTCTATG	C_1204091_10
NAT2*7 (rs1799931)	857 G>A	AATCTCGTGCCCAACCTGGTGATG[A/G]ATCC CTTACTATTTAGAATAAGGAA	C_572770_20
NAT2*14 (rs1801279)	191 G>A	TTTGATCACATTGTAAGAAGAAACC[A/G]GGGT GGGTGGTGTCTCCAGGTCAAT	C_572771_10
CYP2E1*5 (rs3813867)	-1293 G>C	AACGCCCTTCTTGTTTCAGGAGAG[G/C]TGCA GTGTTAGGTGCAGCACAAACCA	C_2431875_10
XDH_1 (rs1042036)	1150 C>G	CACCCCATAGCTGAAGTAGTGGAAG[C/G]GGTT CCCTGAGTTAGTCTCAAAGCT	C_8899071_30
XDH_2 (rs1042039)	4599 C>T	TTTATTCTTTCCAATGATTCAAAGA[C/T]GGTTA GAGGATTTAACCTTACCCCA	C_3279851_10
D543N (rs17235409)	543 G>A	CTTCCTGTATGGGCTCCTTGAAGAG[A/G]ACCA GAAAGGGGAGACCTCTGGCTA	C_25635296_10
INT4 (rs3731865)	469+14 G>C	TACTACCCTAAGGTGAGCTTGGGGG[C/G]CCT GGACAGGGGAGAACCCTGGCCC	C_1659793_10

Las condiciones de amplificación por PCR-Tiempo Real fueron las siguientes:

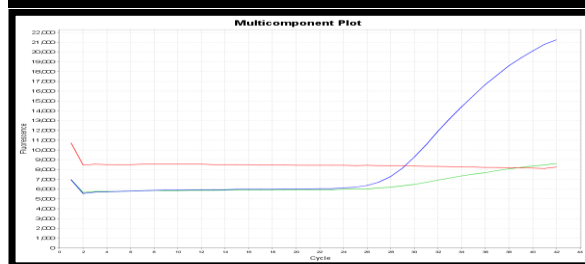
CICLOS	Paso	TEMPERATURA/TIEMPO
40 CICLOS	1	95°C / 10 min
	2	95°C / 15 seg
		60°C / 1 min

La interpretación de los resultados de genotipificación se describe a continuación:

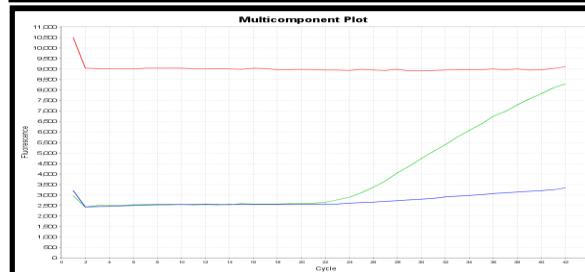
Fluorescencia VIC ó FAM	Interpretación
Fluorocromo VIC™	Homocigosidad del Alelo mutado
Fluorocromo FAM™	Homocigosidad del Alelo silvestre
Ambas señales fluorescentes	Heterocigosidad alelo mutado / Alelo silvestre



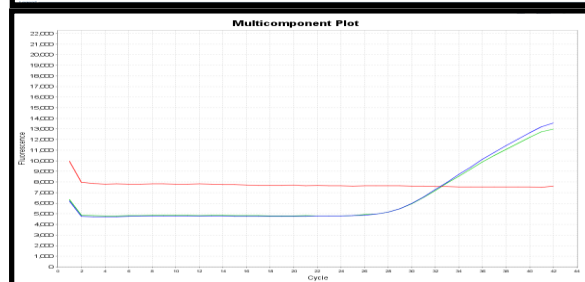
Sin Fluorescencia, control negativo, sin DNA



Homocigosidad del Alelo 2/ Alelo 2
Fluorescencia del Fluorocromo FAM™



Homocigosidad del Alelo 1/ Alelo1
Fluorescencia del Fluorocromo VIC®



Ambas señales fluorescentes
Heterocigosidad

Figura 12. Interpretación de fluorescencia con fluorocromo VIC y FAM en PCR-Tiempo Real StepOne™

5.14.5 DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO ACETILADOR INFERIDO A PARTIR DEL GENOTIPO DE NAT2.

De acuerdo a la nomenclatura consenso (<http://nat.mbg.duth.gr>) los pacientes homocigotos para el alelo silvestre NAT2*4 fueron clasificados como acetiladores rápidos (AR), los individuos heterocigotos con un alelo silvestre y una de las variantes de NAT2 (NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 y NAT2*14) fueron clasificados como acetiladores intermedios (AI), y aquellos individuos que llevaron dos variantes de NAT2 en estado homocigoto o heterocigoto se clasificaron como acetiladores lentos (AL).

5.14.6 DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES GSTM1 Y GSTT1 POR PCR MULTIPLEX

La identificación del alelo nulo (*0) de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se realizó por PCR punto final de acuerdo a la metodología descrita por *Sato et al., 1999* y *Han-chun et al., 2006* adaptada a las condiciones del laboratorio^{144,145}. Como control interno de la reacción se empleó además un par de iniciadores que amplifican el gen constitutivo β -actina. Los iniciadores empleados en la reacción de PCR y el tamaño de los productos se muestran en el Cuadro 4. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l, los reactivos y las condiciones de amplificación se muestran en los cuadros 5 y 6. Los productos de la reacción fueron verificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.0% teñidos con bromuro de etidio a 0.5 μ g/ml y observados en un transiluminador de luz ultravioleta (Figura 13).

Cuadro 4. Iniciadores de PCR para amplificación del gen *GSTM1* y *GSTT1*.

INICIADOR	SECUENCIA	PRODUCTO (bp)
GSTT1-F1	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCT-3'	459
GSTT1-R1	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	
GSTM2-F2	5'-GAACTCCCTGAAAAAGCTAAAGC-3'	210
GSTM2-R2	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	
β-ACTINA-F	5'-TGACGGTCAGGTCATCACTATCGGCAATGA-3'	260
β-ACTINA-R	5'-TTGATCTTCATCGTGATAGGAGCGAGGGCA-3'	

Cuadro 5. Condiciones de amplificación por PCR del gen *GSTM1*.

Reactivos	Concentración	Reacción 1X	Amplificación por PCR
Agua	---	12.75 μ L	• Desnaturalización inicial 94°C 5 min
Buffer Go Flexi Taq	---	5 μ L	
MgCl ₂	2 μ M	2 μ L	• Amplificación 94°C 30 s Desnaturalización
dNTP'S	10 μ M	0.5 μ L	61.6°C 30 s Alineamiento
GSTM1 Forward (5'-3')	10 pM/ μ L	0.75 μ L	72°C 1 min Extensión
GSTM1 Reverse (3'-5')	10 pM/ μ L	0.75 μ L	-----33 CICLOS-----
β -Actina Forward (5'-3')	10 pM/ μ L	0.5 μ L	
β -Actina Reverse (3'-5')	10 pM/ μ L	0.5 μ L	• Extensión final 72°C 30 s
Enzima Go Flexi Taq	5 UI/mL	0.25 μ L	• Etapa final
DNA	5 ng/ μ L	2 μ L	4°C sin tiempo
Volumen final	---	25 μ L	

Cuadro 6. Condiciones de amplificación por PCR del gen *GSTT1*.

Reactivos	Concentración	Reacción 1X	Amplificación por PCR
Agua	---	11.75 μ L	Etapa inicial
Buffer Go Flexi Taq	---	5 μ L	
MgCl ₂	2 μ M	2 μ L	Amplificación
dNTP'S	2.5 μ M	1.5 μ L	
GSTM1 Forward (5'-3')	10 pM/ μ L	0.75 μ L	
GSTM1 Reverse (3'-5')	10 pM/ μ L	0.75 μ L	
β -Actina Forward (5'-3')	10 pM/ μ L	0.5 μ L	94°C 30 s Desnaturalización 58°C 30 s Alineamiento 72°C 30 s Extensión -----30 CICLOS-----
β -Actina Reverse (3'-5')	10 pM/ μ L	0.5 μ L	
Enzima Go Flexi Taq	5 UI/mL	0.25 μ L	Extensión final
DNA	5 ng/ μ L	2 μ L	
Volumen final	---	25 μ L	
			Etapa final 4°C sin tiempo

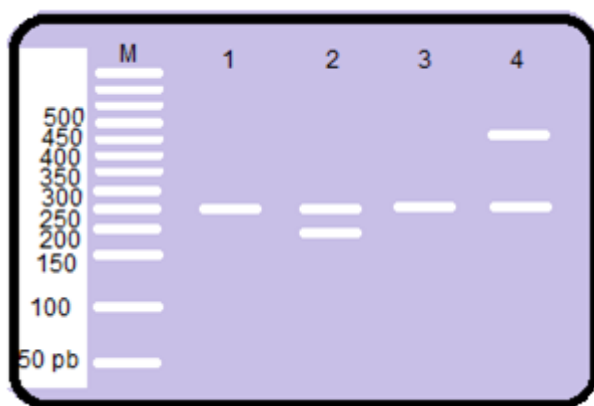


Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR de *GSTM1* y *GSTT1*. Carriles: M, Marcador de peso molecular de 50 pb; 1, *GSTM1*(nulo)/ β -Actina; 2, *GSTM1*/ β -Actina; 3, *GSTT1*(nulo)/ β -Actina; 4, *GSTT1*/ β -Actina.

6.0.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva para calcular media y desviación estándar de las variables estudiadas. Para determinar las diferencias entre grupos fueron empleadas la prueba de chi-cuadrada y U-Mann Whitney de acuerdo a la distribución de los datos. Las frecuencias de los genotipos se obtuvo por conteo directo, y el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se calculó a través de la prueba chi-cuadrada en el programa SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). En este programa estadístico se evaluó la asociación entre los polimorfismos y el fracaso al tratamiento con un modelo de análisis de regresión logística. Se consideró un intervalo de confianza del 95% (IC95%) y un valor de $p \leq 0.05$ para definir el nivel de significancia estadístico. El resto de los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v.17.0 (SPSS Inc, 106 Chicago, IL, EE.UU. 60.606 hasta 6412).

7.0.- RESULTADOS

Se incluyeron un total de 66 pacientes: 33 casos y 33 controles. En el cuadro 7 se muestra la procedencia de los pacientes y el número de muestras recolectadas.

Cuadro 7. Total de pacientes caso y control por estado e institución de salud.

ESTADO	Número de pacientes		INSTITUCIÓN
	CASO	CONTROL	
DURANGO	1	12	INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Y SECRETARIA DE SALUD Centro de Salud No. 2.
VERACRUZ	15	7	HOSPITAL REGIONAL DE ALTA ESPECIALIDAD DE VERACRUZ; Departamento de Epidemiología, Jurisdicción sanitaria No. VIII.
	17	14	INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UMAE Hospital de Especialidades No. 14, C.M.N. "Lic. Adolfo Ruiz Cortines" y UMF# 57, 61 Y 68.
TOTAL DE PACIENTES	33	33	

Todos los pacientes firmaron la carta de consentimiento informado antes realizar cualquier procedimiento del estudio, posteriormente se les aplicó una encuesta de tipo socio-demográfica con las variables de estudio que se muestran en el cuadro 8. Únicamente se encontraron diferencias significativas entre casos y controles en la aplicación de la vacuna BCG, con una frecuencia más alta en el grupo control (88%) que en el grupo de casos (60%) ($p=0.01$).

Cuadro 8. Características demográficas de los pacientes agrupados en casos y controles.

Variable	Casos 33	Controles 33	Valor de p
Hombre, n (%)	23 (70)	18 (55)	0.21 ^a
Mujer, n (%)	10 (31)	15 (45)	
Edad (años)	49.7 ± 16.1	49.6 ± 15.8	0.90 ^b
Peso (Kg)	58.0 ± 16.3	60.9 ± 15.0	0.15 ^b
Talla (m)	1.6 ± 0.09	1.5 ± 0.09	0.37 ^b
Índice de Masa Corporal (Kg/m ²)	21.5 ± 4.8	23.9 ± 5.7	0.07 ^b
Diabetes Tipo 2, n (%)	16 (48)	11 (33)	0.21 ^a
Fumadores, n (%)	2 (6)	7 (21)	0.07 ^a
Consumo de Drogas, n (%)	1 (3)	6 (18)	0.06 ^a
Consumo de Alcohol, n (%)	4 (12)	5 (15)	0.72 ^a
Vacuna BCG, n (%)	20 (60)	29 (88)	0.01 ^a
COMBE, n (%)	16 (49)	21 (64)	0.22 ^a

Promedio ± Desviación estándar, n, número; ^a χ^2 cuadrada, ^bU-Mann Whitney

7.1.- FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE LOS POLIMORFISMOS DE *NAT2*.

La frecuencia de los polimorfismos del gen *NAT2* fue similar entre casos y controles. El alelo más frecuente en la población general fue *NAT2*5* (~30%), seguido de *NAT2*6* que fue mayor en casos que en controles (18% vs 9%, respectivamente) (Cuadro 9). La frecuencia de individuos heterocigotos para *NAT2*5* fue significativamente mayor en casos (55%) que en controles (27%) ($p=0.005$), y solo se identificaron individuos homocigotos para *NAT2*5* en el grupo control (15%) ($p=0.02$). En el resto de las frecuencias genotípicas no se observaron diferencias significativas. Todos los alelos se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg.

Cuadro 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de *NAT2* en casos y controles.

<i>NAT*5</i>				<i>NAT*6</i>			
	Casos	Control	Valor de p ^a		Casos	Control	Valor de p ^a
341T>C	N=33 n(%)	N=33 n(%)		590G>A	N=33 n(%)	N=33 n(%)	
T	48 (73)	47 (71)	0.84	G	54 (82)	60 (91)	0.12
C	18 (27)	18 (29)		A	12 (18)	6 (9)	
T/T	15 (45)	19 (58)	0.49	G/G	21 (64)	27 (82)	0.38
T/C	18 (55)	9 (27)	0.005	G/A	12 (36)	6 (18)	0.15
C/C	0 (0)	5 (15)	0.020	A/A	0 (0)	0 (0)	--
<i>NAT*7</i>				<i>NAT*14</i>			
	Casos	Control	Valor de p ^a		Casos	Control	Valor de p ^a
857G>A	N=33 n(%)	N=33 n(%)		191G>A	N=33 n(%)	N=33 n(%)	
G	59 (89)	57 (86)	0.59	G	64 (97)	66 (100)	0.49
A	7 (11)	9 (14)		A	2 (3)	0 (0)	
G/G	26 (79)	26 (79)	1.00	G/G	31 (94)	33 (100)	0.49
G/A	7 (21)	5 (15)	0.56	G/A	2 (6)	0 (0)	0.49
A/A	0 (0)	2 (6)	0.49	A/A	0 (0)	0 (0)	--

^a χ^2 cuadrada**7.2. FENOTIPO ACETILADOR INFERIDO DE LOS GENOTIPOS DE *NAT2*.**

Los resultados del ensayo de genotipificación por PCR tiempo real nos permitieron asignar haplotipos de acuerdo a la nomenclatura consenso (<http://nat.mbg.duth.gr>). La frecuencia del fenotipo AL fue similar entre casos y controles. Los genotipos mas frecuentes entre los AL fueron el *5/*5 que se presentó solo en el grupo control (15%) y el *5/*6 que fue más frecuente en el grupo de casos que en el de controles (12% vs 6%). La frecuencia de AI fue significativamente mayor en el grupo de casos (63%) que en el de controles (36%) (p=0.027). Los genotipos más frecuentes entre los AI

fueron el *4/*5 y *4/*6 en un porcentaje mayor de individuos en el grupo de casos que en el de controles (33% vs 15% y 18% vs 12%, respectivamente). La frecuencia de AR fue tres veces mayor en el grupo control (30%) que en el grupo de casos (9%), con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.03$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Fenotipo acetilador inferido de los genotipos de NAT2 en casos y controles.

Genotipo NAT2	Casos N=33	Controles N=33	Valor de p^a	Fenotipo inferido	Valor de p^a
*5 / *5	0	15	0.02		
*5 / *6	12	6	0.392		
*5 / *7	6	6	1	AL	
*5 / *14	3	0	0.314		0.592
*6 / *7	6	0	0.151		
*7 / *7	0	6	0.151		
Total	27	33			
*4 / *5	33	15	0.085		
*4 / *6	18	12	0.492		0.027
*4 / *7	9	9	1	AI	
*4 / *14	3	0	0.314		
Total	63	36			
*4 / *4	9	30	0.03	AR	0.03
Total	9	30			

^a χ^2 cuadrada

7.3 FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE LOS POLIMORFISMOS DE *CYP2E1*, *XDH*, *GSTM1* y *GSTT1*.

La frecuencia del polimorfismo *CYP2E1**5 se encontró en aproximadamente el 20% de la población general. No se obtuvieron diferencias significativas en la frecuencia de heterocigotos entre casos y controles, y no fueron identificados sujetos homocigotos para esta variante. El alelo 4599C>T de *XDH* se identificó en casos con una frecuencia y en un porcentaje relativamente alto (50%) a diferencia de los controles (30%) con un valor de $p = 0.046$ (Cuadro 11). El alelo 1150 C>G de *XDH* no fue detectado.

Para el caso de *GSTM1**0 y *GSTT1**0, la reacción de PCR empleada para su detección no permite discriminar los genotipos heterocigotos (*1/*0) de los homocigotos silvestres (*1/*1), es por eso que no se describen las frecuencias alélicas. La frecuencia de individuos homocigotos para el alelo *GSTM1**0 fue similar entre casos y controles (45% vs 42%, respectivamente). A diferencia de los sujetos homocigotos para *GSTT1**0 en el que se encontraron diferencias significativas entre casos (3%) y controles (18%) ($p=0.005$) (Cuadro12).

Todos los alelos se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg excepto los alelos de *GSTM1* (*0 y *1 $EHW < 0.0001$).

Cuadro 11. Frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2E1*5* y alelos de *XDH* en casos y controles.

<i>CYP2E1*5</i>				<i>XDH</i>			
-1293G>C	Casos	Control	Valor de p ^a	4599 C>T	Casos	Control	Valor de p ^a
	N=33 n(%)	N=33 n(%)			N=33 n(%)	N=33 n(%)	
G	52 (79)	50 (76)	0.67	C	24 (36)	18 (27)	0.262
C	14 (21)	16 (24)		T	42 (64)	48 (73)	
G/G	19 (58)	17 (53)	0.62	C/C	3 (9)	4 (12)	0.689
G/C	14 (42)	16 (47)	0.62	C/T	18 (55)	10 (30)	0.046
C/C	0	0	--	T/T	12 (36)	19 (58)	0.084

<i>XDH</i>			
1150 C>G	Casos	Control	Valor de p ^a
	N=33 n(%)	N=33 n(%)	
C	66 (100)	66 (100)	1.00
G	0 (0)	0 (0)	
C/C	33 (100)	33 (100)	1.00
C/G	0	0	--
G/G	0	0	--

^a χ^2 cuadrada

Cuadro 12. Frecuencias genotípicas de *GSTM1* y *GSTT1* en casos y controles.

Genotipo	<i>GSTM1</i>			<i>GSTT1</i>		
	Casos n=33	Controles n=33	Valor de p	Casos n= 33	Controles n= 33	Valor de p
(+/+) y (+/-)	36 (55)	38 (58)	0.72	64 (97)	54 (82)	0.005
(-/-)	30 (45)	28 (42)		2 (3)	12 (18)	

N, número, (%), χ^2 cuadrada

7.4 FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE LOS POLIMORFISMOS DE *NRAMP1*.

La frecuencia del alelo A del polimorfismo *D543N G>A* fue significativamente más alta en el grupo de casos que en el de controles (53% vs 14%, respectivamente, $p<0.0001$). El genotipo silvestre G/G fue significativamente mas frecuente en el grupo control que en el grupo de casos (79% vs 24%, respectivamente, $p<0.0001$), mientras que los genotipos heterocigoto G/A y homocigoto A/A fueron más frecuentes en el grupo de casos que en el de controles ($p<0.05$) (Cuadro 13). La frecuencia del alelo C de *INT4 G>C* fue similar entre casos y controles al igual que las frecuencias genotípicas.

Cuadro 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de *NRAMP1* en casos y controles.

	<i>D543N G>A</i>				<i>INT4 G>C</i>		
	Caso 33 N(%)	Control 33 N(%)	Valor de p ^a		Caso 33 N(%)	Control 33 N(%)	Valor de p ^a
G	31 (47)	57 (86)	<0.0001	G	45 (68)	45 (68)	1.00
A	35 (53)	9 (14)		C	21 (32)	21 (32)	
G/G	8 (24)	26 (79)	<0.0001	G/G	17 (52)	15 (45)	0.62
G/A	15 (46)	5 (15)	0.01	G/C	11 (33)	15 (45)	0.31
A/A	10 (30)	2 (6)	0.02	C/C	5 (15)	3 (9)	0.45

^a χ^2 cuadrada

7.5. ASOCIACIÓN DE *NAT2* y *NRAMP1* CON FRACASO AL TRATAMIENTO.

El análisis de regresión multivariado crudo mostró que el genotipo T/C de *NAT2**5 (341 T>C) se asoció significativamente con fracaso al tratamiento (OR 3.20; IC 95% 1.14-8.94, p=0.023) bajo un modelo de herencia sobredominante. Al ajustar por la variable BCG (la única que mostró diferencias entre casos y controles) la asociación se mantiene (OR 2.95; IC 95% 1.01-8.63, p=0.04). Al realizar el análisis en hombres y mujeres por separado la asociación se pierde.

Asimismo, el genotipo G/A del polimorfismo D543N de *NRAMP1* se asoció con fracaso al tratamiento (OR 11.61; IC 95% 3.6-36.7, p<0.0001) bajo un modelo de herencia dominante. Al ajustar por la variable BCG, la asociación se mantiene (OR 2.95; IC 95% 1.01-8.63, p=0.04). Cuando el análisis se realiza ajustado por género, la asociación con fracaso al tratamiento se mantiene solo en los hombres (OR 11.09; IC 95% 3.46-35.5, p<0.0001).

Por otro lado, el genotipo *GSTT1* *0/*0 mostró un valor de OR de 0.14 (IC 95% 0.02-1.24, p=0.036) lo que sugiere un posible efecto protector contra fracaso al tratamiento.

7.6 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Se realizó un análisis por haplotipos y se encontró que el alelo A de *D543N G>A* con los alelos G o C del polimorfismo *INT4 G>C* se asociaron con fracaso al tratamiento (Cuadro 14).

Cuadro 14. Asociación de haplotipos del gen *NRAMP1* con fracaso al tratamiento.

COMBINACIÓN	HAPLOTIPO		FRECUENCIA (%)	OR ^a (CI95%)	Valor de p ^a
	D543N G>A	INT4 G>C			
2	A	G	21	7.42(2.01-27.3)	0.0037
4	A	C	11	3.70 (1.07-12.84)	0.043

^a Prueba Exacta de Fisher's

8.0.- DISCUSIÓN

La TB es una de las enfermedades infecciosas que ocasionan mayor morbilidad y mortalidad a nivel global. La única vacuna disponible para su control es la BCG, sin embargo, su eficacia en la protección contra la tuberculosis pulmonar es cuestionable¹⁴⁴. A pesar de esto, la inmunización con BCG es considerada un factor protector contra formas graves de TB, tales como TB miliar y meningoencefalitis¹⁴⁶. Las principales causas de fracaso al tratamiento^{7,8} son la drogoresistencia¹⁴⁷, falta de adherencia al tratamiento¹⁴⁸ y antecedente de tratamiento previo¹⁴⁹. Durante los últimos años se ha descrito un incremento en la frecuencia de fracaso al tratamiento en países con altas tasas de resistencia a isoniácida y rifampicina. Asimismo se ha determinado el efecto de los polimorfismos del gen *NAT2* en el metabolismo de anti-fímicos como un factor de riesgo para desarrollar hepatotoxicidad^{74,150}. Personas con baja actividad con *NAT2* tienen mayor riesgo de desarrollar trastornos hepáticos que aquellas con alta actividad¹⁵¹. La explicación más aceptada es que hidracina, el producto del metabolismo de isoniácida, es la responsable de desarrollar esos desórdenes hepáticos¹⁵². Se ha descrito que la hidracina se acumula en el plasma en el siguiente orden $AL > AI > AR$ de *NAT2*, y es la encargada de generar radicales libres que pueden ser la causa del desarrollo de los desórdenes hepáticos (Fukino et al., 2008). En nuestro estudio se infirió el fenotipo acetilador a partir del genotipo de *NAT2*. Aunque no hubo diferencias en la frecuencia de AL entre casos y controles, el número de AI (acetiladores intermedios) fue significativamente mayor en el grupo de casos (63%) ($p=0.027$) en quienes además el fenotipo AR fue menos frecuente (9%) que en los controles (30%) ($p=0.03$). El alto porcentaje de AI en el grupo de casos de este estudio podría ser un factor que haya influido en el fracaso al tratamiento por efectos de hepatotoxicidad. Estudios *in vitro* realizados por Walraven et al., 2008; Hein y Doll, 2012 han evaluado el efecto funcional de los haplotipos identificados en este estudio, los cuales se han asociado con una disminuida actividad catalítica de *NAT2*. Nuestros resultados muestran que la variante *NAT2*5* en estado heterocigoto fue la más frecuente entre los AI del grupo de casos y la que se asoció significativamente

con fracaso al tratamiento (OR 3.20; IC 95% 1.14-8.94, $p=0.023$), bajo un modelo de herencia sobredominante. Lo anterior sugiere que *NAT2*5* afecta la eliminación de isoniácida provocando la acumulación de metabolitos hepatotóxicos y aumentando el riesgo de fracaso al tratamiento. NAT2 convierte la isoniácida en acetilisoniácida (excretada por los riñones) que a través de la acción de una amidasa puede convertirse en acetilhidracina y luego en metabolitos hepatotóxicos por el CYP2E1. La acetilhidracina puede ser acetilada todavía más por NAT2 en diacetilhidracina, que no es tóxica. En esta situación un AR separará y eliminará con rapidez la acetilhidracina, mientras que un AI, AL o con inducción de CYP2E1 generará metabolitos más tóxicos. La rifampicina es un inductor potente de CYP2E1 que eleva la hepatotoxicidad producida por isoniácida¹⁵³. En este proceso también participan las enzimas glutatión-S-transferasas GSTM1 y GSTT1 que catalizan la conjugación de glutatión a los metabolitos tóxicos generados por la actividad de CYP2E1 y NAT2¹⁵⁴. *Strange RC et al 2000* menciona que sujetos con genotipo homocigoto nulo para *GSTM* y *GSTT* presentan una disminución en la actividad enzimática¹⁵⁵. Se ha descrito que pacientes homocigotos para *GSTT*0* y *GSTM1*0* son más susceptibles a hepatotoxicidad inducida por anti-fímicos a diferencia en aquellos pacientes con solo uno de estos genes deletado¹⁰⁸. De acuerdo con *Leiro et al., 2008*, en Caucásicos solo el genotipo homocigoto de *GSTT1*0* se asoció con lesión hepática, mientras que esta última se asoció a *GSTM1*0* en poblaciones de la India¹⁰⁸, Taiwan¹⁰⁷, y Japón¹⁵⁶ como se describió en un reciente meta-análisis¹⁵⁷. Por el contrario, en otros estudios no se encontró tal asociación con la delección de ambos genes *GST*^{158,159} y recientemente se describió que los polimorfismos de *NAT2* tienen una mayor contribución en la hepatotoxicidad que *GSTM1*0* y *GSTT1*0*¹⁶⁰. En el presente estudio el genotipo *GSTT1*0/*0* fue más frecuente en el grupo control que en el grupo de casos (18% vs 3%, respectivamente) ($p=0.05$) y el análisis de regresión mostró que el alelo *GSTT1*0* se asoció negativamente con fracaso al tratamiento [OR: 0.14, 95% IC (0.02-1.24); $p=0.036$] lo que sugiere un efecto protector. Es probable que en ausencia de *GSTT1* el proceso de detoxificación sea más lento, lo cual mantiene más tiempo en plasma los metabolitos activos, favoreciendo el efecto terapéutico. A

este respecto, un estudio reciente reportó que la variante nula de *GSTM1*0* y *GSTT1*0* tiene una contribución menor al daño hepático causado por la exposición a los fármacos anti-tuberculosis¹⁶³. *Katsumi Fukino et al., 2008*, han descrito que las concentraciones plasmáticas de hidracina estaban disminuidas en pacientes con genotipo *GSTT1*0/*0* que en aquellos con genotipo wild-type. La influencia de *GSTT1* podría confirmarse con el aumento del tamaño de muestra.

El genotipo *Mycobacterium tuberculosis Shanghai* es considerada una de las cepas más agresivas asociadas al fracaso del tratamiento¹⁶¹. En contraste *Yang et al., 2012*, demostraron una falta de asociación entre la cepa Beijing resistente a los medicamentos y el fracaso del tratamiento¹⁶². Por lo tanto, aunque este estudio no evaluó el genotipo de la cepa, no representa un factor de confusión para el fracaso al tratamiento observado. Una limitación del estudio es la ausencia de pruebas de susceptibilidad a los anti-fímicos que podría generar sesgo en nuestros resultados. La presencia de resistencia a anti-fímicos es un factor no controlado en nuestro país como lo muestra una reciente revisión sobre drogorresistencia (DR) en México, en la que se reportó una media de 37,5% y 20,6% en las tasas de resistencia a los medicamentos y a múltiples fármacos (MDR), respectivamente. Sin embargo, la tasa varió entre las regiones de estudio, en el caso de Veracruz las tasas de DR y MDR fueron de 25 y 6,2% respectivamente¹⁶³. En el estado de Durango, según la información proporcionada por el laboratorio estatal de salud pública, las tasas fueron de 5,0% y 0,05% para DR y MDR, respectivamente, durante el periodo del estudio. El fracaso al tratamiento en pacientes con TB radica no sólo en la cepa bacteriana, debe considerarse además la contribución inmunogenética del paciente. En el presente estudio, se evaluó el gen *SLC11A1/NRAMP1* el cual codifica para un receptor de macrófagos que actúa estimulando al fagosoma en el interior de la célula para capturar iones Mn^{++} , un cofactor de metaloproteasas necesarias para la replicación bacteriana dentro del fagosoma^{164,165}. Así, la presencia de polimorfismos en el gen afectará el funcionamiento de este receptor favoreciendo la proliferación de la micobacteria liberándose del macrófago para diseminarse y activar la enfermedad. En este estudio se evaluaron dos polimorfismos: *INT4 G>C* y *D543N G>A* en el gen

NRAMP1 en pacientes con TBP activa. Nuestros resultados demuestran una fuerte asociación entre el genotipo G/A del alelo D543N y el fracaso al tratamiento [OR: 11.61, 95% IC (3.6-36.7); $p = <0.0001$]. Al realizar el análisis por género la asociación se mantiene solo en los hombres [OR: 11.09, 95% IC (3.46-35.51); $p = <0.0001$] este resultado coincide con estudios previos que describen al género como un factor de riesgo para el desarrollo de TB¹⁶⁶. Un estudio en Marruecos evaluó los factores de riesgo asociados al fracaso al tratamiento por recaída temprana después del tratamiento inicial; el sexo masculino fue encontrado como un factor de riesgo [OR: 2.29, 95% IC (1.10-4.77); $p = 0.023$]. *Ben-Selma et al., 2012* después de ajustar la frecuencia de los genotipos D543N por género, observó un aumento significativo en la resistencia al desarrollo de TBP activa en mujeres en relación con el genotipo GG wild-type (OR 0.1, $p = 0.03$).

La prevalencia de la tuberculosis y las tasas de incidencia son más altas para los hombres de todas las edades, excepto en la infancia¹⁶⁷. Las razones de estas observaciones son poco conocidas, pero las causas por efectos hormonales o genéticos no se pueden descartar. La combinación del alelo mutante A de D543N con G o C de INT4 mostró una asociación significativa con fracaso al tratamiento ($p = 0.0037$, $p = 0.043$ respectivamente). Para nuestro conocimiento este es el primer estudio que vincula los genes *NAT2* y *NRAMP1* con fracaso del tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar. Por lo tanto, los alelo mutantes C y A de *NAT*5 341 T>C* y D543N G>A de *NRAMP1*, respectivamente, podrían ser alelos de utilidad como blanco terapéutico en el futuro.

9.0.- CONCLUSIONES

1. El genotipo T/C de *NAT2*5* (341 T>C) se asoció significativamente con fracaso al tratamiento de TBP.
2. La frecuencia de AR fue significativamente menor en el grupo de casos ($p=0.03$), mientras que la frecuencia de AI fue significativamente más alta en este mismo grupo con relación a los controles ($p=0.027$).
2. El genotipo G/A del polimorfismo D543N G>A de *NRAMP1* se asoció significativamente con fracaso al tratamiento de TBP solo en el grupo de los hombres.
3. Los haplotipos AG y AC (de D543N G>A e INT4 G>C) se asociaron significativamente con fracaso al tratamiento de TBP.
4. El genotipo silvestre G/G del polimorfismo D543N de *Nramp1* en los hombres así como el genotipo *GSTT1*0/*0* se asociaron negativamente con fracaso al tratamiento, lo que sugiere un posible efecto protector contra fracaso al tratamiento de TBP.

El evaluar marcadores farmacogenéticos es de gran relevancia en nuestro país ya que aportarían información y las bases moleculares para investigaciones epidemiológicas que puedan dar soporte al sector salud para el control de la TB. El desarrollo de ensayos de genotipificación rápidos y económicos en apoyo al presupuesto nacional impactará de forma importante en el tratamiento de la tuberculosis en México.

10.- RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Futuros estudios son necesarios para apoyar el papel de *NRAMP1* variantes en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar y de esta manera contribuir a mejorar el tratamiento de la tuberculosis.

Sin embargo con los resultados obtenidos en nuestro estudio y con los reportes mostrados anteriormente sobre las principales causas de un fracaso al tratamiento, se propone el siguiente algoritmo para establecer que parámetros pueden tomarse en cuenta para detectar a tiempo un fracaso al tratamiento anti-fímico en pacientes con tuberculosis pulmonar.

Algoritmo para la detección de un fracaso al tratamiento en pacientes con TBP

ALGORITMO	
FRACASO AL TRATAMIENTO ANTI-FÍMICO	PARÁMETROS DE RIESGO
	<u>CLÍNICOS</u> - Falta de adherencia al tratamiento - Tratamiento anti-fímico previo - Drogorresistencia - Género Masculino <u>GENÉTICOS</u> - FARMACOGENÉTICOS ✓ Genotipo heretocigoto NAT2*5 T/C ✓ Fenotipo Acetilador Intermedio - INMUNOLÓGICOS ✓ Gen <i>NRAMP1</i> ✓ SNP D543N G/A ✓ Haplotipos D543N –INT4 (AG-AC)

11- ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO



Durango, Dgo., a ____ de _____ de 20__

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado *“Asociación de la farmacogenética y variantes del gen NRAMP1 con la respuesta al tratamiento de pacientes con tuberculosis pulmonar”* registrado ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con el No. R-2013-785-014 y por el Comité Local de Investigación y Ética del Hospital General de Durango con número de oficio 308/012 y Hospital de Alta Especialidad de Veracruz con número de registro 001/2014.

El objetivo del estudio es determinar marcadores genéticos en el paciente que lo pueden hacer más susceptible a presentar fracaso al tratamiento en pacientes con la enfermedad. Los resultados obtenidos podrán mejorar la prevención de desarrollo de tuberculosis multidrogorresistente y disponer de tratamientos más seguros.

Se me ha explicado que si acepto participar se me realizará historia clínica y una encuesta de tipo socio-económico que dura aproximadamente 5 minutos. Asimismo, proporcionaré una muestra sangre total (dos tubos de 3 a 5 ml) donde se evaluarán aspectos genéticos tales progresión de la enfermedad y fracaso al tratamiento. Se me ha explicado que estas muestras de material biológico evaluadas como parte de este estudio. También se me ha mencionado que alguna fracción de ellas puede ser congeladas y utilizadas como comparación con pacientes que se incluyan en estudios futuros.

Debido a que en este proyecto se obtendrán muestras biológicas en las siguientes casillas señalo mi desición a este respecto.

☐ ☐ No autorizo que se tome la muestra

☐ ☐ Si Autorizo que se tome la muestra solo para este estudio

☐ ☐ Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio y estudios futuros

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre las molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio. La venopunción (el piquete) de la vena del antebrazo para la extracción de sangre causará un poco de dolor y en ocasiones sangrado leve que generalmente cede con la presión. La cantidad de sangre extraída no representa riesgo para mi. El resultado de los exámenes laboratorio puede ser útil en caso de que mi médico necesite modificar mi tratamiento. Además los resultados finales del estudio aunque no sean de utilidad directa para mi pueden contribuir a prevenir y mejorar el tratamiento de otras personas afectadas por la tuberculosis. El investigador principal me ha asegurado de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento enque lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo. En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con los procedimientos de estudio podrá dirigirse con: Dr. Gerardo Martínez Aguilar al tel: 618 8254503 o 618 1346460, Dra. Martha Sosa Macías tel: 618 1380553, Dr. Carlos Galaviz 618 1492868 y con la M. en C. Yvain Salinas Delgado al tel: 618 1978822. En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque “ B ” de la Unidad de Congresos, Col. Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55)56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: conise@imss.gob.mx

Nombre y firma del paciente

Nombre, dirección, relación con paciente testigo (1)

Nombre, dirección, relación con paciente testigo (2)

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo de las siguientes instituciones y profesionales que hicieron posible el término de este proyecto:

- **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

- **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional CIIDIR-IPN DURANGO**

Dra. en C. Martha Guadalupe Sosa Macías, Dr. en C. Carlos Galaviz Hernández, Dr. en C. Ismael Lares Asseff.

- **Centro de Salud No. 2 de la Secretaria de Salud**

Dr. Antonio Rojas Martínez; Epidemiólogo y a todo su equipo de trabajo.

- **Epidemiología del IMSS de Durango**

Dr. Carlos Arturo Reyna Morja

- **HOSPITAL REGIONAL DE ALTA ESPECIALIDAD DE VERACRUZ; Departamento de Epidemiología, Jurisdicción sanitaria No. VIII.**

Dra. Rosa Isela Chaparro Martínez, Dra. Carmen Amor Avila Rejon

- **INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UMAE Hospital de Especialidades No. 14, C.M.N. “Lic. Adolfo Ruiz Cortines” y UMF# 57, 61 Y 68.**

Dr. René García Toral, Dra. Zita A. Fernández García,
Dra. Maria Saadia Verdalet Guzman

- **CONACyT**

- **BECAS BEIFI (PIFI)**

A todos Muchas Gracias

Asociación de la farmacogenética y variantes del gen *NRAMP1* con el fracaso al tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar

Fecha:

			2	0		
DIA	MES		AÑO			

NOMBRE:			
Apellido	Paterno	Materno	Nombre(s)

UNIDAD : ☐ IMSS ☐ ISSSTE ☐ CS (1) (2) ☐ OTRO **ESTADO:** ☐ Durango ☐ Veracruz

Diagrama de la jerarquía de los datos de la encuesta:

- Calle
 - Número exterior
 - Interior
 - Colonia
- Municipio
- Código postal
- Teléfono

¿USTED TRABAJA? ☐ Si ☐ No (PASE A DATOS GENERALES)

NOMBRE DE LA EMPRESA: **UBICACIÓN:**

OCUPACIÓN O PUESTO EN SU TRABAJO:

EDAD: Años. **SEXO:** ☐ Hombre ☐ Mujer

Actualmente vive usted ☐ Solo(a) ☐ Con sus hijos ☐ Con su esposo(a) Otro _____

¿Cada cuando se reúne la familia?

¿Cuántas personas viven con usted?

¿Usted ha viajado al extranjero? ¿En qué año? ¿A qué lugar, país, etc? ¿Cuánto tiempo permaneció ahí?

¿Cuál es su lugar de nacimiento? _____

¿Cuál es su lugar de residencia? ¿Cuánto tiempo tiene viviendo ahí?

¿Pertenece a algún grupo indígena? No Si Mencione el grupo

¿Cuál es el lugar de nacimiento de sus padres?_____

[illegible]

ADICCIONES (Durante el tratamiento anti-tuberculosis)**1.- TABAQUISMO**

1. ¿Ha convivido con personas que fuman? ☐ Si ☐ No ¿Desde hace cuánto tiempo? Años Meses
2. ¿Usted fuma? ☐ Si ☐ No (PASE A LA SECCIÓN DE ADICCIONES)

Otros:

Observaciones: (NS)= No sabe

2.1 ¿A qué edad fumó su primer cigarrillo? | | Años.

2.2 Si actualmente fuma: ¿Cuál es el número máximo que fuma al día? | | Cigarrillos

2.3 Si fumó pero actualmente ya no fuma: ¿Hace cuánto tiempo dejó de fumar? | | Años.

2.- ADICCIONES

- ¿Alguna vez consumió alguna droga ilícita? ☐ Si ☐ No (PASE A LA SECCIÓN DE ALCOHOLISMO)
- ¿Cuál?
- ¿Actualmente consume alguna droga ilícita? ☐ Si ☐ No ¿Cuál?

3.- ALCOHOLISMO

- ¿Toma usted bebidas alcohólicas? ☐ Si ☐ No (PASE A LA SECCIÓN DE TRATAMIENTOS)
- ¿Cada cuándo consume bebidas alcohólicas?
- ☐ Diario ☐ Una vez a la semana ☐ Una vez al mes ☐ Una vez al año
- ¿Qué cantidad aproximadamente de bebida alcohólica toma usted (sin contar los refrescos que utiliza)?
- ☐ Menos de 100 ml ☐ 100 ml (un vaso chico) ☐ 200 ml (un vaso mediano) ☐ Más de 200 ml Número de Cervezas:

TRATAMIENTOS CONCOMITANTES

- ¿Qué fármacos toma o tomaba durante el tratamiento anti-TB?
- ¿Ha tenido alguna reacción adversa por tomar algún fármaco en otras ocasiones? ¿A qué fármaco(s)?
- ¿Usted toma o tomó multivitaminas durante el tratamiento anti-TB? Sí No ¿En qué año?
- ¿Cuántas veces por semana las consume o consumió? Especifique marca y tipo:
- ¿Consumo o consumió anticonceptivos? Especifique marca y tipo

VACUNACIÓN

- ¿Le aplicaron una vacuna durante el tratamiento? ☐ Si ☐ No ¿Cuál vacuna le aplicaron?
- ¿Tiene cicatriz de la vacuna de la tuberculosis? ☐ Si ☐ No
- ¿Le han aplicado la prueba del PPD? ☐ Si ☐ No ¿Hace cuánto tiempo?
- ¿Qué resultado salió? ☐ Positivo ☐ Negativo ¿Presentó alguna reacción secundaria?

CLASIFICACIÓN DE CONTROL o CASO

CONTROL

¿Cómo recibió o está recibiendo el tratamiento? Supervisado Auto-administrado
Yvain de los A. Salinas Delgado — CHDIR IPN Unidad Durango — Doctorado en Ciencias en Biotecnología

En caso de tratamiento auto-administrado; ¿Cada cuándo recibió nuevas pastillas? cada semana cada quincena

¿Qué tipo de tratamiento recibió o está recibiendo?

¿Alguna vez tuvo tuberculosis? No Sí
 Tratamiento primario completo: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol. 2 HRZE/ 4 HR. 60 dosis totales
Fecha de diagnóstico de tuberculosis: ¿Alguna vez convivió con personas con tuberculosis? No Sí ¿Con quién?
 Tratamiento primario regular: Mismos fármacos pero solo cumplió con el 90% o más de las citas programadas para recibir tratamiento.
¿Qué prueba fue utilizada para su diagnóstico? Baciloscopía Cultivo Radiografía de Tórax Datos Clínicos
 Tratamiento primario incompleto: Abandono del tratamiento
¿Terminó el tratamiento? Sí ¿En qué año? ¿Se curó? Si (ir a sección de CONTROL) No (ir a sección de CASO)
¿Le realizaron baciloscopía durante el tratamiento? Sí No ¿Por qué? (ir a sección de CASO)
No ¿Por qué?
¿Le realizaron baciloscopía al terminar el tratamiento? Sí ¿Cuál fue el resultado? Negativo Positivo

OBSERVACIONES:

No ¿Por qué?

OBSERVACIONES:

¿Le realizaron cultivo? No Sí ¿En qué fecha?

¿Cuál fue el resultado? Bacteria Susceptible a: Resistente a:

CASO

1er diagnóstico de tuberculosis

¿Cómo fue diagnosticada la enfermedad por primera vez? ☐ Baciloscopía ☐ Radiografía de Tórax ☐ Datos Clínicos

¿En qué año fue diagnosticado por primera vez con TB? _____ ¿Terminó el tratamiento? Sí ☐ No ☐ ¿En qué año? _____ ¿Se curó? _____

¿Cuántas veces ha recibido el tratamiento anti-tuberculosis? _____ ¿En qué año? _____

¿Cómo recibió el tratamiento? ☐ Supervisado ☐ Auto-administrado

En caso de tratamiento auto-administrado; ¿Cada cuándo recibió nuevas pastillas? ☐ cada semana ☐ cada quincena

¿Qué tipo de tratamiento recibió?

☐ Tratamiento primario completo: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol. 2 HRZE/ 4 HR. 60 dosis totales

☐ Tratamiento primario regular: Mismos fármacos pero solo cumplió con el 90% o más de las citas programadas para recibir tratamiento.

☐ Tratamiento primario incompleto: Abandono del tratamiento

¿Cuál fue la causa de abandono al tratamiento? ☐ Reacción alérgica al medicamento ☐ Reacción adversas (ir al recuadro)

Otras causas: _____

REACCIÓN ADVERSA

☐ Neuropatía periférica

☐ Hepatotoxicidad

☐ Hipersensibilidad al o los medicamentos: especifique _____

☐ Gota

☐ Vértigo

☐ Pérdida de capacidad auditiva

☐ Rash cutáneo

☐ Alteración de la visión

Otras: _____

¿Cómo fue diagnosticada la enfermedad por primera vez? ☐ Baciloscopía ☐ Radiografía de Tórax ☐ Datos Clínicos

¿Le realizaron baciloscopías al terminar el tratamiento? Sí ☐ No ☐ ¿Cuántas le realizaron? _____

¿Cuál fue el resultado? Negativo ☐ Positivo ☐

En caso de un resultado positivo ¿Continuó el mismo tratamiento? Sí ☐ No ☐

¿Le realizaron cultivo? No ☐ Sí ☐ ¿Cuál fue el resultado? Bacteria _____ Susceptible a: _____ Resistente a: _____

NOTA: Tratamiento primario; Fase intensiva: 60 dosis totales de isoniácida, rifampicina, pirazinamida, diarias de lunes a sábado por 6 semanas ó 2 meses. Personas con peso mayor a 50 kg, 90 dosis totales por 25 semanas. Fase de sostén: 30 dosis totales de isoniácida y rifampicina tres veces por semana por 12 semanas o 4 meses.

2.- Segundo diagnóstico de TB (Recaída ó Fracaso)

¿En qué año fue diagnosticado? _____ ¿Terminó el tratamiento? _____ Sí _____ ¿En qué año? _____

¿Cómo recibió el tratamiento? _____ Supervisado _____ Auto-administrado No _____ ¿Por qué? * _____

En caso de tratamiento auto-administrado; ¿Cada cuándo recibió nuevas pastillas? _____ cada semana _____ cada quincena

¿Qué tipo de tratamiento recibió?

_____ Tratamiento primario completo: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol. 2 HRZE/ 4 HR. 60 dosis totales

_____ Tratamiento primario regular: Mismos fármacos pero solo cumplió con el 90% o más de las citas programadas para recibir tratamiento.

_____ Tratamiento primario incompleto: Abandono del tratamiento

_____ Tratamiento primario (re-tratamiento): (2 meses de H+R+Z+E+S; 1 mes de H+R+Z+E y 5 meses de H+R+E diario o trisemanal) 90 dosis totales

_____ Tratamiento de 2da línea: Etambutol, Estreptomina, Amikacina, Ciprofloxacina, Kanamicina, Capreomicina, Rifabutina, Rifapentina, Etionamida, Proteonamida, Ofloxacina, Levofloxacina y moxifloxacina (seleccionar los que esta o estuvo consumiendo)

*¿Por qué? _____ Actualmente recibe tratamiento _____ Reacción adversas (ir al recuadro)

Otras causas: _____

REACCIÓN ADVERSA

_____ Neuropatía periférica

_____ Hepatotoxicidad

_____ Hipersensibilidad al o los medicamentos: especifique _____

_____ Gota

_____ Vértigo

_____ Pérdida de capacidad auditiva

_____ Rash cutáneo

_____ Alteración de la visión

Otras: _____

¿Le realizaron baciloscopías al terminar el tratamiento? Sí _____ No _____ ¿Por qué? _____

¿Cuántas le realizaron? _____ ¿Cuál fue el resultado? Negativo _____ Positivo _____

En caso de un resultado positivo ¿Continuó el mismo tratamiento? Sí _____ No _____

¿Le realizaron cultivo? No _____ Sí _____ ¿Cuál fue el resultado? Bacteria _____ Susceptible a: _____ Resistente a: _____

NOTA: Fase inicial; Etionamida, Fluoroquinolona, Cicloserina (inyectables) por 6 meses(o hasta obtener antibiograma). Fase de continuación; Etionamida, Fluoroquinolona, Cicloserina por 12-18 meses. Pueden proporcionarse también fármacos como Kanamicina, Amikacina, Capreomicina, Rifabutina, Rifapentina, ácido para-aminosalicílico, Proteonamida, Ciprofloxacina, ofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Terizidona.

CONTROL

¿Cómo recibió o está recibiendo el tratamiento? ____Supervisado ____ Auto-administrado

En caso de tratamiento auto-administrado; ¿Cada cuándo recibió nuevas pastillas? ____cada semana ____ cada quincena

¿Qué tipo de tratamiento recibió o está recibiendo?

____ Tratamiento primario completo: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol. 2 HRZE/ 4 HR. 60 dosis totales

____ Tratamiento primario regular: Mismos fármacos pero solo cumplió con el 90% o más de las citas programadas para recibir tratamiento.

____ Tratamiento primario incompleto: Abandono del tratamiento

¿Le realizaron baciloscopia durante el tratamiento? Sí ____ No ____ ¿Por qué? _____

¿Le realizaron baciloscopia al terminar el tratamiento? Sí ____ ¿Cuántas? _____ ¿Cuál fue el resultado? Negativo ____ Positivo ____

No ____ ¿Por qué? _____

En caso de un resultado positivo ¿Continuó el mismo tratamiento? Sí ____ No ____ ¿Qué tratamiento recibió? _____

¿Le realizaron cultivo? No ____ Sí ____ ¿En qué fecha? _____

¿Cuál fue el resultado? Bacteria _____ Susceptible a: _____ Resistente a: _____

ANCESTRÍA

¿Cuál es su lugar de nacimiento? _____

¿Cuál es su lugar de residencia? _____ ¿Cuánto tiempo tiene viviendo ahí? _____

¿Pertenece a algún grupo indígena? No ____ Si ____ Mencione el grupo _____

¿Cuál es el lugar de nacimiento de sus padres? _____

SOMATOMETRÍA

Peso _____ Talla: _____ Cintura: _____ Cadera _____

RESULTADOS DE LABORATORIO

Elaboró: _____ Responsable del proyecto _____

ANEXO 3. Método de Extracción de DNA por columnas QIAmp. Kit QIAGEN®

Procedimiento

1. Adicionar 200 µL de sangre en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
2. Agregar 20 µL de Proteinasa K.
3. Adicionar 200 µL de Buffer AL (solución de lavado proporcionado por la marca del proveedor).
4. Incubar a 56°C por 10 min.
5. Centrifugar por 30 s / 1 m aproximadamente.
6. Adicionar 200 µL de Etanol (96-100%) a la muestra y mezclar en vórtex por 15 s.
7. Centrifugar 30 s para remover burbujas.
8. Pasar el mezclado a una columna QIAmp en un tubo de 2 mL.
9. Centrifugar a 8000 rpm (6000 Xg / min). Nota: centrifugar de nuevo si no se filtró totalmente.
10. Descartar el filtrado.
11. Adicionar 500 µL de buffer AW1 (solución proporcionada por la marca del proveedor) a la columna QIAmp.
12. Centrifugar a 8000 rpm ó 6000 Xg por minuto y descartar el filtrado.
13. Adicionar 500 µL de buffer AW2 (solución proporcionada por la marca del proveedor) a la columna QIAmp y centrifugar a 14,000 rpm por 3 min.
14. Centrifugar nuevamente por 1 minuto.
15. Pasar en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL a una nueva columna QIAmp.
16. Adicionar a la columna 200 µL de Buffer AE ó agua destilada.
17. Incubar a 15-25°C por 5 min y centrifugar a 8000 rpm por 1 min.

11.0- BIBLIOGRAFIA

¹World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control, 2014.

² Catharina W., SCD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. The Journal of cells, molecules systems and technologies: 2008; 10: 1365-2567.

³ CENAPRECE. Datos y retos en tuberculosis farmacorresistente en México. 18 Curso de actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis en el niño y el adulto. Secretaria de salud. Junio 2014 <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/TBMDRMexicoal2014.pdf>).

⁴ Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993).

⁵ Abbate E. H., Guía Práctica Elaborada Por La Sección Tuberculosis. Asociación Argentina De Medicina Respiratoria. Buenos Aires 2007; 67: 295-305.

⁶ Schaberg T, Rebhan K, Lode H., Risk factors for side-effects of isoniazid rifampicin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. Eur. Respir. J. 1996; 9: 2026-30.

⁷ Becerra MC, Freeman J, Bayona J, et al., Using treatment failure under effective directly observed short-course chemotherapy programs to identify patients with multidrug-resistant tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2000; 4 (2):108-14.

⁸ Yoshiyama T, Yanai H, Rhiengtong D, et al., Development of acquired drug resistance in recurrent tuberculosis patients with various previous treatment outcomes. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2004; 8 (1): 31-8.

⁹ Bertz, R.J. y Granneman, G.R., Use of in vitro and *in vivo* data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. Clin. Pharmacokinet.1997; 32, 210-258.

¹⁰ Pharmacogenomics and Personalized Medicine. Cap. 6 2008.

-
- ¹¹ Kalow W., Pharmacogenetics. Heredity and the response to drugs. London: Saunders Company, 1962.
- ¹² Tostmann A., Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. JGH 23. 2008; 192-202; 1440-1746.
- ¹³ Ramaswamy S, Musser J., Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 1998 update. Tuber. Lung. Dis. 1998; 79 (1): 3-29.
- ¹⁴ Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ., Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14 (4): 836-71.
- ¹⁵ Zhang Y., Yew W. W., Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2009; 13 (11):1320–1330.
- ¹⁶ Matthys F, Rigouts L, Sizaire V, Vezhnina N, Lecoq M, Vera G, Portaels F, Van der Stuyft P, Kimerling M, Outcomes after Chemotherapy with WHO Category II Regimen in a Population with High Prevalence of Drug Resistant Tuberculosis. PLoS ONE 2009; 4 (11).
- ¹⁷ Palomino JC., New diagnostic for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. Curr. Opin. Pulm. Med. 2006; 12: 172-8.
- ¹⁸ Li HT, Zhang TT, Zhou YQ, Huang QH, Huang J., *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a metaanalysis. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10:3–12.
- ¹⁹ Zhang W, Shao L, Weng X, Hu Z, Jin A, Chen S, Pang M, and Chen Z, Variants of the Natural Resistance–Associated Macrophage Protein 1 Gene (*NRAMP1*) Are Associated with Severe Forms of Pulmonary Tuberculosis *Clin Infect Dis*. 2005; 40 (9): 1232–1236.
- ²⁰ Van Crevel R, Parwati I, Sahiratmadja E, Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Strains Is Associated with Polymorphisms in *SLC11A1/NRAMP1* in Indonesian Patients with Tuberculosis. JID 2009: 200.

²¹ World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control, 2012.

²² Fuentes Domínguez F. J, Epidemiología de la tuberculosis. Secretaría de Salud del Estado de Veracruz. Marzo 2014. (<http://web.ssaver.gob.mx/tuberculosis/files/2014/04/EPIDEMIOLOGIA-DE-LA-TB-en-Veracruz.pdf>) Consulta septiembre 2014.

²³ World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control, 2015.

²⁴ Manual de Curso Latinoamericano Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina, UCV, Caracas, Venezuela 2004.

²⁵ Espinal MA, Pérez EN, Baéz J, Hénriquez L, Fernández K, Lopez M, Olivo P, Reingold AL .Infectiousness of Mycobacterium tuberculosis in HIV-1-infected patients with tuberculosis: a prospective study. Lancet. 2000; 22 (355): 275-80

²⁶ González Roldan JF, 18 Curso de Actualización en el Diagnóstico y Tratamiento de la Tuberculosis en el Niño y el Adulto. Epidemiología y Determinantes Sociales en Tuberculosis. Junio 2014.

²⁷ Carmona O. VI Curso Internacional de biología molecular. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 2004; 24 (1-2):110-114.

²⁸ Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya V, Enfermedades Infecciosas. 6^{ta}edición. Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003: 830.

²⁹ WHO. Global tuberculosis report. 2014. World Health Organization; 2014. WHO 2014 from [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>] September 2014.

³⁰ Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos. Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Julio 2010.

³¹ Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Bacilosκόpio. Subsecretaria de prevención y promoción de la Salud.

-
- ³² Fuentes ML, Tuberculosis: Un problema en Expansión. (<http://mexicosocial.org/index.php/mexico-social-en-exelsior/item/208-tuberculosis-un-problema-en-expansi%C3%B3n.html>) Consulta Marzo 2015.
- ³³ Cacho Carranza Y, Epidemiología de la Tuberculosis en México. (http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/1103-epidemiologia-de-la-tuberculosis-en-mexico?utm_source=newsletter_333&utm_medium=email&utm_campaign=conacyt-newsletter-13-2015). Consulta Marzo 2015.
- ³⁴ Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005 Geneva, World Health Organization. (WHO/HTM/TB/2005.349).
- ³⁵ Schaberg T, Rebhan K, Lode H. Risk factors for side-effects of isoniazid rifampicin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. Eur. Respir. J. 1996; 9: 2026-30.
- ³⁶ <http://diagnosticotb.blogspot.com/2011/01/que-es-la-tb-pulmonar.html>
- ³⁷ Diaz Molina R, Cornejo Bravo JM, Ramos Ibarra MA, Estrada Guzman J, Morales Arango D, Reyes Baez R. Genotype and phenotype of NAT2 and the occurrence of adverse drug reactions in Mexican individuals to an isoniazid-based prophylactic chemotherapy for tuberculosis. Molecular Medicine Reports 2008.
- ³⁸ Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos. Julio 2010
- ³⁹ Storla DG, Rahim Z, Islam MA, Plettner S, Begum V, Myrvang B, Drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in the Sunamganj District of Bangladesh. Scand. J. Infect. Dis. 2007; 39:142-5.
- ⁴⁰ Martínez–Medina M A, Efecto del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) sobre la adherencia y la tasa de curación de la tuberculosis pulmonar. Gac. Méd. Méx. 2004; 140 (1).

-
- ⁴¹ Valenzuela P. Utilidad de los estudios a medicamentos antituberculosos. *Rev. Panam. Salud Pública/Pan. Am. J. Public. Health*; 1997; 1: 62-7.
- ⁴² Espinal MA, Kiim SJ, Hong YP, Treatment outcome of multidrug-resistant tuberculosis cases under programme conditions. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 1998; 2: 371.
- ⁴³ Meza García M, Accínelli-Tanaka R, Campos Meza J, Mendoza Requena D, Factores de riesgo para el fracaso del tratamiento antituberculoso totalmente supervisado. Lima Perú. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v15n1/facto_riesgo.htm. Consulta 30-sep-2014.
- ⁴⁴ Zhang W, Shao L, Weng X, Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (NRAMP1) are Associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40:1232-6
- ⁴⁵ Kritski AL, Marques MJ, Rabani MF. Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1996; 153 (1): 331-5.
- ⁴⁶ Lineamientos para manejo del paciente con Tuberculosis multirresistente. Sociedad Peruana de Neumología. 1997.
- ⁴⁷ Castillejos López MJ, Pérez Padilla R, Quiñones Falconi F, García Sancho Figueroa MC, Implicaciones de los polimorfismos de un solo nucleótido en *Mycobacterium tuberculosis* y humanos en el manejo clínico de la tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2006; 19 (1): 38-46.
- ⁴⁸ Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 581–620.

⁴⁹ Manjunath P. Pai, Pharm D; Kathryn M. Momary, PharmD, y Keith. A. Rodvold, Pharm D. Interacciones Farmacológicas de los Antibióticos. Med. Clin. N. Am. 2006; 90: 1223-1255.

⁵⁰ González FJ, Tukey RH. Drug metabolism. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11^a ed. McGraw-Hill; 2006: 71-91.

⁵¹ Banda Gurrola S, Guevara EJ, Chávez Ramírez H, Farmacogenética y farmacogenómica: hacia una medicina personalizada. Rev. Fac. Med. UNAM. 2010; 53 (2).

⁵² Lal S. Effect of rifampicin and isoniazid on liver function. BMJ 1972; 1: 148-50.

⁵³ Girling DJ. The hepatic toxicity of tuberculosis regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. Tubercle 1978; 59: 13-32.

⁵⁴ Namdar R. Drugs for tuberculosis. In: Piscitelli SC, Rodvold KA, editors. Drugs interactions in infections diseases. 2nd edition. Totowa (NJ) Humana Press; 2005: 191-213.

⁵⁵ Flockhart DA (2007). Drug Interactions: Cytochrome P₄₅₀ Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine.

⁵⁶ Tanaka E, Terarda M, Misawa S. Cytochrome P4502E1. Its clinical and toxicological role. J. Clin. Pharm. Ther. 2000; 25:165-175.

⁵⁷ Lucas D, Ferrara R, Gonzales E, Albores A, Manno M, Berthou F. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. Toxicol. Lett. 2001; 124: 71-81.

⁵⁸ Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. Toxicol. Lett. 2000; 112-113: 357-363.

⁵⁹ Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Human ethanol inducible P450IIE1: complete sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. Biochemistry 1988; 13: 9006-9013.

⁶⁰ Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIIE1 gene. *J Biochem* 1991; 110: 559–65.

⁶¹ Wang SL, Lee H, Chen KW, Tsai KJ, Chen CY, Lin P. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer* 1999; 26: 27-34.

⁶² Stephens EA, Taylor JA, Kaplan n, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell Da. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African- Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 185-192.

⁶³ Gordillo Bastidas E, Panduro A, Gordillo Bastidas D, Zepeda Carrillo EA, García Bañuelos JJ, Muñoz Valle JF, Polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes in indigenous Mexican population: unusual high frequency of CYP2E1*c2 allele. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2010; 34: 142–9.

⁶⁴ Mendoza Cantú A, Castorena Torres F, Bermudez M, Martínez Hernández R, Ortega A, Salinas JE, Genotype and allele frequencies of polymorphic cytochromes P450 CYP1A2 and CYP2E1 in Mexicans. *Cell Biochem. Funct.* 2004; 22: 29–34.

⁶⁵ Deguchi T. *J Biol. Chem.* 1992; 267 (25): 18140–18147 [PubMed: 1381364].

⁶⁶ Grant DM, Morike K, Eichelbaum M, Meyer UA. *J. Clin. Invest.* 1990; 85(3): 968–972.

⁶⁷ Silvera Redondo C, Arias I, Lecompte N, Visbal L, Curiel L, Hernández E, Vargas Alarcón G. Frecuencias alélicas y genotípicas del gen NAT2 en poblaciones wiwa y chimila del caribe colombiano. *Iatreia Revista médica Universidad de Antioquia.* 2012; 23: 4-5

⁶⁸ Jason M. Walraven, Yu Zang, John O. Trent, and David W. Hein. Structure/Function Evaluations of Single Nucleotide Polymorphisms in Human N Acetyltransferase 2. *Curr. Drug. Metab.* 2008; 9(6): 471–486.

⁶⁹ Hein DW, Boukouvala S, Grant DM, Minchin RF, Sim E. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18 (4):367–368.

-
- ⁷⁰ Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2002; 506- 507:65-77.
- ⁷¹ Dupret JM, Grant DM. Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine N-acetyltransferase expressed in E Coli: evidence for direct involvement of Cys68 in the catalytic mechanism of polymorphic human NAT2. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 7381-7385.
- ⁷² Grant DM, Blum M, Demierre A, Meyer UA. Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17: 3978.
- ⁷³ Doll MA, Zang Y, Yeager M, Welch R, Chanock S, Hein DW. Homo sapiens N-acetyltransferase (NAT2) gene, NAT2*5I allele, complete cds. GenBank 2003, AY23052.
- ⁷⁴ Hein DW, Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K. Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant human wild-type, mutant and chimeric NAT2 alloenzymes. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 729-734.
- ⁷⁵ Delomenie C, Goodfellow GH, Krishnamoorthy R, Grant DM, Dupret JM. Study of the role of the highly conserved residues Arg9 and Arg64 in the catalytic function of the human N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 1997; 323: 207-215
- ⁷⁶ Vulleimer N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, Mermillod B, Nicod L, Desmeules J, Hochstrasser D. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 2006; 6: 423-429.
- ⁷⁷ Roy B, Ghosh SK, Sutradhar D, Sikdar N, Mazumber S, Barman S. Predisposition of antituberculosis drug induced hepatotoxicity by cytochrome P450 2E1 and haplotype in pediatric patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:781-786.
- ⁷⁸ Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto I, Ogura T, Maeda K, Komuta K, Igarashi T, Azuma J. Slow Nacetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Disease* 2000; 4: 256-261.

⁷⁹ Bozok Cetintas V, Erer OF, Kosova B, Ozdemir I, Topcuoglu N, Aktogu S, Eroglu Z. Determining the relation between N-acetyltransferase-2 acetylator phenotype and antituberculosis drug induced hepatitis by molecular biologic tests. *Tuberk Toraks* 2008; 56: 81-86.

⁸⁰ Hein DW. *Oncogene* 2006; 25(11):1649–1658.

⁸¹ Lin HJ, Han CHY, Lin BK, Hardy S. Slow acetylator mtations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 asians, blacks, Hispanics and whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet* 1993; 52:827-834.

⁸² Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoler J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J hum Genet* 1995; 57: 581-592

⁸³ Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CHS, Nam MH, Kim JW, Lee SY. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2007; 87: 551-556.

⁸⁴ Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD, Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 883-888

⁸⁵ Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Aupret JM, Price-Evans DA, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV, Sim E, Suzuki T, Yamazoe Y. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 1-17.

⁸⁶ Lu JF, Cao XM, Liu ZH, Cao W, Guo LQ, Zhuo HT, Ling SS, Chen YL, Zhao Q, Wang WP and Li FQ: Genetic analysis of N-acetyltransferase polymorphism in a Chinese population. *Acta Pharmacol Sin* 19: 347-351, 1998.

⁸⁷ Rodríguez JW, Kirilin WG, Ferguson RJ, Doll MA, Gray K, Rustan TD, Lee ME, Kemp K, Urso P and Hein DW: Human acetylator genotype: relationship to colorectal cancer incidence and arylamine N-acetyltransferase expression in colon cytosol. *Arch Toxicol* 67: 445-452, 1993.

-
- ⁸⁸ Yu MC, Skipper PL, Taghizadeh K, Tannenbaum SR, Chan KK, Henderson BE and Ross RK: Acetylator phenotype, aminobiphenyl- hemoglobin adduct levels, and bladder cancer risk in white, black, and Asian men in Los Angeles, California. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86; 712-716.
- ⁸⁹ Meyer UA and Zanger UM: Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37; 269-296.
- ⁹⁰ Mrozikiewicz PM, Cascorbi I, Brockmöller J and Roots I: Determination and allelic allocation of seven nucleotide transitions within the arylamine N-acetyltransferase gene in the Polish population. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 59; 376-382.
- ⁹¹ Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM and Roots I: Arylamine N acetyltransferase (NAT2) genotypes in a Turkish population. *Pharmacogenetics* 1997; 7; 327-331.
- ⁹² Lin HJ, Han CY, Lin BK and Hardy S: Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* 1994; 4; 125-134.
- ⁹³ Martínez C, Agúndez JA, Olivera M, Llerena A, Ramirez R, Hernández M and Benítez J: Influence of genetic admixture on polymorphisms of drug-metabolizing enzymes: analyses of mutations on NAT2 and CYP2E1 genes in a mixed Hispanic population. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63; 623-628.
- ⁹⁴ Fukino Kitsumi, Sasaki Y, Hirai S, Nakamura T, Hashimoto M, Yamagishi F, Ueno K 2008. Effects of NAT2, CYP2E1 and GST genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients. *J. Toxicol. Sci.*, 33: 187-195.
- ⁹⁵ Simon T, Becquemont L, Mary-Krause., et al. Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67: 432-7.
- ⁹⁶ Adreoli SP, Mallet CP., et al. Role of glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury. *J. Lab Clin Med* 1986; 108: 190-8.

-
- ⁹⁷ Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase gene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30: 445–600.
- ⁹⁸ Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases—structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem.* 1988; 23: 283–337.
- ⁹⁹ Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 2000; 112-113:357-363.
- ¹⁰⁰ Reszka E, Wasowicz W. Significance of genetic polymorphisms in glutathione S-transferase multigene family and lung cancer risk. *Int J Occup Med Environ Health.* 2001; 14(2): 99-113.
- ¹⁰¹ Seidegard J, and Ekström G. *The Role of Human Glutathione Transferases and Epoxide Hydrolases in the Metabolism of Xenobiotics. Environ Health Perspect.* 1997; 105 (4): 791-802.
- ¹⁰² Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001; 482 (1–2): 21–26.
- ¹⁰³ Hussey AJ et al. Variations in the glutathione S-transferase subunits expressed in human livers. *Biochim Biophys Acta* 1986; 874: 1-12.
- ¹⁰⁴ Pemble S, Schroeder KR, et al. Human glutathione transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300: 271-6.
- ¹⁰⁵ Thier R, Bruning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health* 2003; 206:149-171.
- ¹⁰⁶ Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998; 273: 3517-3527.

-
- ¹⁰⁷ Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005; 221: 123-129.
- ¹⁰⁸ Huang YS, Su WJ, et al. Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H: quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptoibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol* 2007; 47: 128-34.
- ¹⁰⁹ Roy B, Chowdhury A, Kundu S, Santra A, et al. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S- transferase M1 'null' mutation. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1033-7.
- ¹¹⁰ Tung-Yuan Shih, Chien-Yi Pai, Ping Yang, Wen-Liang Chang, Ning-Chi Wang, Oliver Yoa-Pu Hu. Novel Mechanism Underlies the Hepatotoxicity of Pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57; (4): 1685–1690.
- ¹¹¹ Yamamoto T, Higashino K, Kono N, Kawachi M, Nanahoshi M, Takahashi S, Suda M, Hada T. Metabolism of pyrazinamide and allopurinol in hereditary xanthine oxidase deficiency. *Clin Chim Acta*. 1989; 180 (2):169-75.
- ¹¹² Tung-Yuan Shih,^a Chien-Yi Pai,^b Ping Yang,^b Wen-Liang Chang,^b Ning-Chi Wang,^c Oliver Yoa-Pu Hu. A Novel Mechanism Underlies the Hepatotoxicity of Pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57 (4): 1685–1690.
- ¹¹³ Steele MA, Des Prez RM. The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest* 1988; 94 (4): 845-50.
- ¹¹⁴ Lacroix C, Hoang TP, Nouveau J, et al. Pharmacokinetics of pyrazinamide and its metabolites in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36: 395-400.
- ¹¹⁵ Tostmann A, Aarnoutse R, Peters W, Richard PN, and Boeree Martin, Xanthine oxidase inhibition by allopurinol increases in vitro pyrazinamide-induced hepatotoxicity in HepG2cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 2010; 33(3): 325-328.

-
- ¹¹⁶ Yee D, Valiquette C, Pelletier M, Parisien I, Rocher I, Menzies D, Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2003; 167: 1472–1477.
- ¹¹⁷ Ichida K, Amaya Y, Noda K, Minoshima S, Hosoya T, Sakai O, Shimizu N, Nishino T (November 1993). «Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene». *Gene*, 133 (2): 279–84.
- ¹¹⁸ Kudo M, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Ujiie S, Onose A, Mizugaki M, Ishikawa M and Hiratsuka M, Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet. Genomics*, 2008; 18: 243–251.
- ¹¹⁹ Graa OA, Kozhekbaeva ZM, Skotnikova OI, Litvinov VI, and Nasedkina TV, Analysis of Genetic Predisposition to Pulmonary Tuberculosis in Native Russians. *Russian Journal of Genetics*, 2010; 46 (2): 230–238.
- ¹²⁰ Jing Jin, Lin Sun, Weiwei Jiao, Shunying Zhao, Huimin Li, Xiaolei Guan, Anxia Jiao, Zaifang Jiang, and Adong Shen. *SLC11A1* (Formerly *NRAMP1*) Gene Polymorphisms Associated with Pediatric Tuberculosis in China *CID* 2009; 48; 733-738.
- ¹²¹ Supek F, Superkova L, Nelson H, Nelson N. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5105-10.
- ¹²² Agronoff D, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol* 1998; 28: 403-412.
- ¹²³ Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC, 1-alpha 25-inmmunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells, *J. Clin. Invest.* 1984; 57:159-63.
- ¹²⁴ Murray CJ, Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1990; 65: 6-24.

-
- ¹²⁵ Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Celler M, Schurr E, Fuks A, Bumstead N, Morgan K, Gros P. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp1* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 1994; 23: 51-61.
- ¹²⁶ Gruenheid D, Pinner E, Desjardins M, Gros P. Natural resistance to infection intracellular pathogens: the *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 1997; 185: 717-30.
- ¹²⁷ Yang J, Downes K, Howson J, Nutland S, Stevens H, Walker N and Todd J. Evidence of association with type 1 diabetes in the *SLC11A1* gene region. *BMC Medical Genetics* 2011; 12: 59.
- ¹²⁸ Holmes CB, Hausler H, Nunn P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:96–104.
- ¹²⁹ Leung KH, Yip SP, Wong WS, Sex- and age-dependent association of *SLC11A1* polymorphisms with tuberculosis in Chinese: a case control study. *BMC Infect Dis* 2007; 7:19.
- ¹³⁰ Geneva, World Health Organization. (WHO/HTM/TB/2005.349).
- ¹³¹ Ryu S, Park YK, Baj GH, et al. 3'UTR polymorphisms in the *NRAMP1* gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int.J.Tuberc.Lung Dis* 2000; 4: 577-80.
- ¹³² Malik S, Abel L, Tooker H, et al. Alleles of the *NRAMP1* gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:12183–8.
- ¹³³ Gallant CJ, Malik S, Jabado N, et al. Reduced in vitro functional activity of human *NRAMP1* (*SLC11A1*) allele that predisposes to increased risk of pediatric tuberculosis disease. *Genes Immun* 2007; 8:691–8.
- ¹³⁴ Dunstan SJ, Ho VA, Duc CM, et al. Typhoid fever and genetic polymorphisms at the natural resistance-associated macrophage protein 1. *J Infect Dis* 2001; 183: 1156–60.

-
- ¹³⁵ Liaw YS, Tsai-Wu JJ, Wu CH, et al. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility of tuberculosis in Taiwanese. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 454–60.
- ¹³⁶ Shaw MA, Collins A, Peacock CS, et al. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes *NRAMP1* and *TNFA*. *Tuber Lung Dis* 1997; 78: 35–45.
- ¹³⁷ Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. *NRAMP1* and *TNF-Alpha* polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. *Respiratory*. 2007; 12: 202-206.
- ¹³⁸ Niño Moreno P, Portales Pérez D, Hernández Castro B, Portales Cervantes L, Flores Meraz V, Baranda L, Gómez Gómez A, Acuña Alonzo V, Granados J and González Amaro R. *P2X7* and *NRAMP1/SLC11 A1* gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Experimental Immunology* 2007; 1365-2249.
- ¹³⁹ Delgado JC, Baena A,¹ Sok Thim,⁴ and Anne E. Goldfeld^{1,3}, Ethnic-Specific Genetic Associations with Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 186: 1463–8.
- ¹⁴⁰ Hanta I, Tastemir-Korkmaz D, Demirhan O, Hanta D, Kuleci S. Seydaoglu G. Association of the *Nramp1* gene polymorphisms and clinical forms in patients with tuberculosis. *Bratisl Lek Listy* 2012; 113 (11): 657-660.
- ¹⁴¹ Lin PL, Plessner HL, Voitenko N V, Flynn JA. Tumour necrosis factor and tuberculosis. *J. Invest. Dermatology* 2006; 12: 22-25.
- ¹⁴² Ellis, P. D. *The Essential Guide to Effect Sizes: An Introduction to Statistical Power, Meta-Analysis and the Interpretation of Research Results*. Cambridge University Press 2010.

-
- ¹⁴³ JM L. Introduction to sample size determination and power analysis for curuca. *Contr Clin Trtals*, 1980; 2: 93- 103.
- ¹⁴⁴ Han Chun C, Yan Fei C, Wei Xin H, Xin Fa L, Qing Xia L, Ji Z and Jia L, Genetic polymorphisms of phase II metabolic enzymes and lung cancer susceptibility in a population of Central South China. *Disease Markers* 2006; 22: 141–152.
- ¹⁴⁵ Sato M, Sato T, Izumo T and Amagasa T, Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis* 1999; 20; 1927-1931.
- ¹⁴⁶ Zhang LX, Tu DH, He GX, Ma ZQ, Nagelkerke NJ, Borgdorff MW, et al. Risk of tuberculosis infection and tuberculous meningitis after discontinuation of Bacillus Calmette–Guerin in Beijing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162(4): 1314-7.
- ¹⁴⁷ Wang GJ, Xu JY, Wang GB, Zhen XA, Gao SY, Du CM. Impact of anti-tuberculosis drug resistance on treatment outcome of pulmonary tuberculosis patients receiving directly observed treatment strategy in Henan Province, China. 2006; 29: 527-30.
- ¹⁴⁸ Chen J, Li NX, Wan KL, Yang GJ, Wang Q. Analysis on risk factors of drug resistance for tuberculosis in Sichuan and Anhui Provinces. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 38:135-7.
- ¹⁴⁹ Cox H, Kebede Y, Allamuratova S, Ismailov G, Davletmuratova Z, Byrnes G, Tuberculosis recurrence and mortality after successful treatment: impact of drug resistance. *PLoS Med* 2006; 3: 384.
- ¹⁵⁰ Hiratsuka M, Kishikawa Y, Takekuma Y, et al. Genotyping of the N-acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002; 17: 357-362.
- ¹⁵¹ Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto Y, Ogura T, Maeda K, Komuta K, Igarashi T, Azuma J. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4 (3): 256-61.

-
- ¹⁵² Yue J, Peng RX, Yang J, Kong R, Liu J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25 (5): 699-704.
- ¹⁵³ Vidyasagar Ramappa, Guruprasad P. Aithal. Hepatotoxicity Related to Anti-tuberculosis Drugs: Mechanisms and Management. *J Clin Exp Hepatol* 2013; 3: 37–49.
- ¹⁵⁴ Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK et al. Study of oxidative stress in isoniazid-induced hepatic injury in young rats with and without protein-energy malnutrition. *J Biochem Toxicol*, 1996; 11: 139–146.
- ¹⁵⁵ Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett*, 2000; 112–113:357–363.
- ¹⁵⁶ Fukino K, Sasaki Y, Hirai S, Nakamura T, Hashimoto M, Yamagishi F, Ueno K. 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* 2008; 33.
- ¹⁵⁷ Li C, Long J, Hu X, Zhou Y. GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: an updated meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 2013.
- ¹⁵⁸ Teixeira RL, Morato RG, Cabello PH, Muñiz LM, Moreira Ada S, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, Miranda AB, Santos AR. Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug- induced hepatitis in Brazilian TB patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(6).
- ¹⁵⁹ Chatterjee S, Lyle N, Mandal A, Kundu S. GSTT1 and GSTM1 gene deletions are not associated with hepatotoxicity caused by antitubercular drugs. *J Clin Pharm Ther* 2010; 35: 65-470.
- ¹⁶⁰ Forestiero FJ, Cecon L, Hirouki Hirata M, Fiuza de Melo F, Fressatti Cardoso R, Cerda A, Dominguez Crespo Hirata V. Relationship of NAT2, CYP2E1 and GSTM1/GSTT1 polymorphisms with mild elevation of liver

enzymes in Brazilian individuals under anti-tuberculosis drug therapy. *Clinica Chimica Acta*. 2013; 415: 215-219.

¹⁶¹ Lan NT, Lien HR, Tung le B, Borgdorff MW, Kremer K, Van Soolingen D. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9 (12): 1633-5.

¹⁶² Yang C, Luo T, Sun G, Qiao K, Sun G, DeRiemer K, Mei J, Gao Q. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains favor transmission but not drug resistance in China. *Clin Infect Dis*. 2012; 55(9): 1179-87.

¹⁶³ Flores-Treviño S, Mendoza-Olazarán S, Garza-González E, resistencia a los medicamentos y la epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en México: una revisión sistemática. *Salud Pública Méx* 2014; 56: 63-67.

¹⁶⁴ Supek F, Superkova L, Nelson H, Nelson N. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(10): 5105-10.

¹⁶⁵ Walid Ben-Selma, Hedi Harizi, Mahmoud Letaief, Jalel Boukadida. Age- and gender-specific effects on NRAMP1 gene polymorphisms and risk of the development of active tuberculosis in Tunisian populations. *International Journal of Infectious Diseases* 2012; 16; 543–550.

¹⁶⁶ Shepherd N, Alasdair L, Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*. 2014; 15: 209.

¹⁶⁷ OMS, Género y la tuberculosis http://www.who.int/género/other_health/es/genderTB.pdf. Consultado el 26 de marzo 2015.