

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACION DEL GENOTIPO N-ACETIL  
TRANSFERASA 2 (NAT2) EN UNA MUESTRA DE LA  
POBLACION DEL NORESTE DE MEXICO

POR

M.V.Z. EDUARDO BELARMINO PEREZ MEDINA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

MONTERREY, N. L.

JULIO DE 2005

TM

QH455

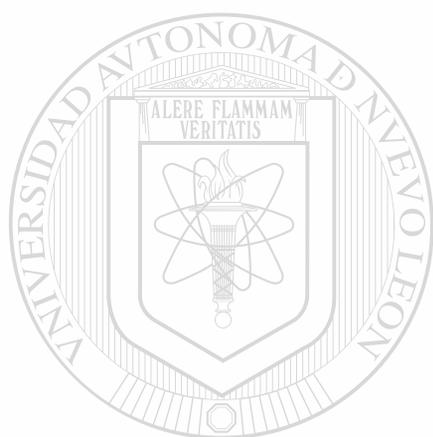
.P4

2005

c.1



1080127618



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN DEL GENOTIPO N-ACETILTRANSFERASA 2  
(NAT2) EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE  
MÉXICO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

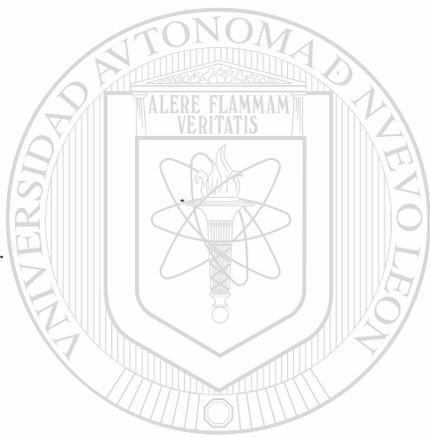
POR

M.V.Z EDUARDO BELARMINO PÉREZ MEDINA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA  
GENÉTICA**

MONTERREY, N.L.

JULIO DE 2005



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# **CARACTERIZACIÓN DEL GENOTIPO N-ACETILTRANSFERASA 2 (NAT2) EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO**

**Aprobación de la Tesis:**



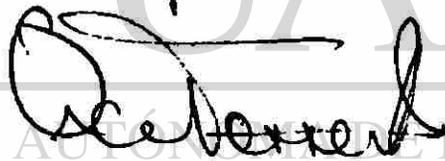
---

**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Director de Tesis



---

**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
Co-Director de Tesis



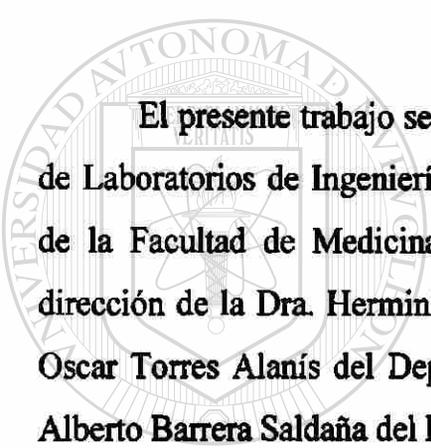
---

**DR. OSCAR TORRES ALANIS**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector  
de Estudios de Posgrado



**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez y la codirección del Dr. Oscar Torres Alanís del Departamento de Farmacología y Toxicología y el Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña del Departamento de Bioquímica.**

---

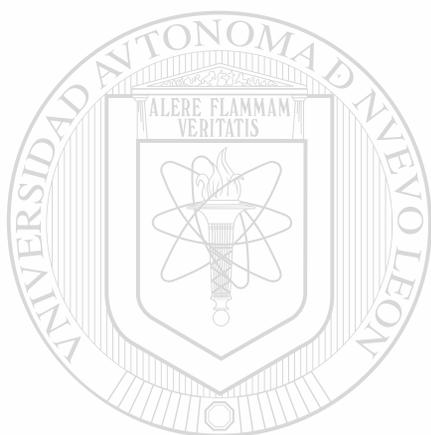
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

**A mi asesor principal la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, quien me dio la oportunidad, su confianza y el tiempo necesario para la realización de esta investigación, con quien trabajé muy a gusto.**

**Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña, por su colaboración como co-director y en la revisión de esta tesis.**

**Al Dr. Oscar Torres Alanis, por su contribución como co-director y en la revisión de esta tesis.**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## DEDICATORIAS

**A mi esposa Sandra**, que es la persona más importante para mí, quien con su dedicación y apoyo me alentó en la superación tanto en mi carrera como de esta tesis.

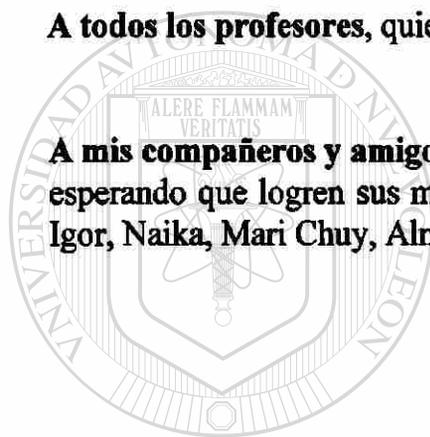
**A mis hijos**, que los quiero mucho.

**A mis padres**, les dedico esta tesis por su apoyo y aliento.

**A mis hermanos**, quienes me alentaron a seguir adelante.

**A todos los profesores**, quienes compartieron conmigo sus conocimientos.

**A mis compañeros y amigos de generación**, con quienes compartí dos años de mi vida, esperando que logren sus metas y tengan éxito en la vida (Juan Carlos, Ángel, Karina, Igor, Naika, Mari Chuy, Alma).



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>LISTA DE TABLAS</b>	x
<b>NOMENCLATURA</b>	xii
<b>RESUMEN</b>	xiv

<b>CAPITULO</b>	<b>Página</b>
-----------------	---------------

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Polimorfismos	2
1.2 Farmacogenética.	3
1.3 Genómica ambiental	4
1.3.1 Variación en la respuesta ambiental genética	5
1.3 Presión de selección ocupacional	6
1.5 Clasificación de enzimas por su mecanismo de acción	6
1.6 N-Acetiltransferasa	8
1.6.1 La familia del gen arilamina N-acetiltransferasa	9
1.6.2 Características estructurales de las proteínas NAT	10
1.6.3 Mecanismo de acción y especificidad de sustrato	11
1.6.4 Localización del gen, estructura y expresión	11
1.6.5 Alelos NAT2 Humanos	13
1.6.6 Frecuencia del fenotipo acetilador	18
1.6.7 Patrón de Acetilación	18
1.6.8 NAT y la respuesta a los fármacos	19
1.6.9 NAT2 y enfermedades	23
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
2.1 Justificación	26
2.2 Objetivo general	27
2.3 Objetivos específicos	27

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1 Área de trabajo, reactivos y equipo	28
3.1.1 Área Física	28
3.1.2 Criterios de Inclusión de los Individuos en el Estudio	28
3.1.3 Material Biológico	28
3.1.4 Reactivos químicos	28
3.1.5 Material consumible	29
3.1.6 Equipo	30
3.1.7 Programas de análisis computacional	30
3.2 Métodos	31
3.2.1 Estrategia General	31
3.2.2 Extracción de DNA genómico por la técnica de TSNT	32
3.2.2.1 Protocolo	32
3.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	33
3.2.3.1 Fundamento	33
3.2.3.2 Diseño de los Oligonucleótidos	33
3.2.3.3 Condiciones de amplificación	35
3.2.4 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)	37
3.2.4.1 Fundamento	37
3.2.4.2 Digestión	38
3.3 Genotipificación	41
3.3.1 Diferenciación del alelo NAT2*5B de NAT2*4	41
3.3.1.1 Amplificación del fragmento de 578 pb	41
3.3.1.2 Digestión	42
3.3.1.3 Recuperación y purificación de la banda de interés	43
3.3.1.3.1 Protocolo	43
3.3.1.4 Reamplificación del fragmento de 199 pb	44
3.3.1.5 Digestión con la enzima <i>Dde</i> I	44
3.3.2 Diferenciación del alelo NAT2*5B de NAT2*6A	44
3.3.2.1 Amplificación del fragmento de 866 pb	44
3.3.2.2 Digestión	44
3.3.3 Diferenciación del alelo NAT2*5B de NAT2*6B	47
3.3.4 Diferenciación del alelo NAT2*5B de NAT2*6C	47
3.3.5 Diferenciación del alelo NAT2*5B de NAT2*7B	47
3.3.5.1 Amplificación del fragmento de 866 pb	47
3.3.5.2 Digestión	48
3.3.6 Diferenciación del alelo NAT2*5B de NAT2*12A	49
3.3.7 Diferenciación del alelo NAT2*5B de NAT2*12B	49
3.3.8 Diferenciación del alelo NAT2*5A de NAT2*4	50
3.3.9 Diferenciación del alelo NAT2*5C de NAT2*4	50
3.3.9.1 Amplificación del fragmento de 578 pb	50
3.3.9.2 Digestión	50
3.3.10 Diferenciación del alelo NAT2*5C de NAT2*7B	51

3.3.7 Diferenciación del alelo NAT2*13B de NAT2*4	51
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>53</b>
4.1 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica recolectada.	53
4.2 Amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para las regiones donde se han reportado polimorfismos en otras poblaciones.	53
4.2.1 Amplificación del fragmento de 866pb.	53
4.2.2 Amplificación del fragmento de 578pb.	54
4.2.3 Amplificación del fragmento de 141pb.	55
4.2.4 Amplificación del fragmento de 119pb.	55
4.3 Identificación de polimorfismos por RFLP's.	56
4.3.1 Identificación de los polimorfismos en el producto amplificado de 866pb	56
4.3.2 Identificación del polimorfismo T341C en el producto amplificado de 141pb	62
4.3.3 Identificación del polimorfismo A803G en el producto amplificado de 119pb	63
4.4 Análisis de la presencia de los polimorfismos en cada una de las muestras.	64
4.5 Genotipificación	65
4.6 Frecuencia de los alelos variantes de NAT2 en la población estudiada.	80
4.7 Patrón de acetilación	83
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>84</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>88</b>

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE FIGURAS

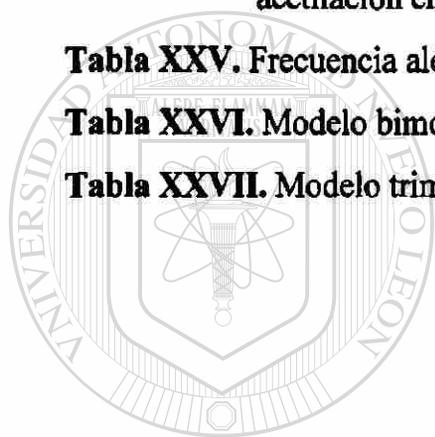
FIGURA	Página
<b>Figura 1.</b> Enzimas de la Fase I y Fase II	7
<b>Figura 2.</b> Localización del gen NAT2	13
<b>Figura 3.</b> Actividad catalítica de NAT2	17
<b>Figura 4.</b> Esquema de la estrategia general	31
<b>Figura 5.</b> Amplificaciones en el exón 2 de NAT2	33
<b>Figura 6.</b> Extracción de DNA genómico	53
<b>Figura 7.</b> Producto amplificado de 866 pb	54
<b>Figura 8.</b> Producto amplificado de 578 pb	54
<b>Figura 9.</b> Producto amplificado de 141 pb	55
<b>Figura 10.</b> Producto amplificado de 119 pb	56
<b>Figura 11.</b> Digestión con las enzimas <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Dra</i> III (A845C)	57
<b>Figura 12.</b> Digestión con la enzima <i>Msp</i> I (G191A, A434C)	58
<b>Figura 13.</b> Digestión con la enzima <i>Hinf</i> I (G857A)	59
<b>Figura 14.</b> Digestión con la enzima <i>Taq</i> I (T111C, G590A, C759T)	60
<b>Figura 15.</b> Digestión con la enzima <i>Taq</i> I (G590A, C759T)	61
<b>Figura 16.</b> Digestión con la enzima <i>Kpn</i> I (C481T)	62
<b>Figura 17.</b> Digestión con la enzima <i>Msp</i> A1 I (T341C)	63
<b>Figura 18.</b> Digestión con la enzima <i>Dde</i> I (A803G)	64
<b>Figura 19.</b> Fragmento de 578 pb digerido con las enzimas <i>Kpn</i> I (C481T) y <i>Msp</i> A1 I (T341C)	66
<b>Figura 20.</b> Digestión con las enzimas <i>Kpn</i> I (C481T) y <i>Msp</i> A1 I (T341C)	67
<b>Figura 21.</b> Secuencia recuperada con el polimorfismo A803G, reamplificada y diferida con la enzima <i>Dde</i> I (A803G)	67
<b>Figura 22.</b> Producto reamplificado de 119 pb	68
<b>Figura 23.</b> Digestión con la enzima <i>Dde</i> I (A803G)	68
<b>Figura 24.</b> Digestión con la enzima <i>Msp</i> A1 I (T341C)	69

<b>Figura 25.</b> Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Kpn</i> I (C481T), para identificar el polimorfismo C481T	70
<b>Figura 26.</b> Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Kpn</i> I (C481T), para identificar el polimorfismo C282T	71
<b>Figura 27.</b> Digestión con la enzima <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Kpn</i> I (C481T)	72
<b>Figura 28.</b> Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas <i>Kpn</i> I (C481T) y <i>Taq</i> I (G590A), para identificar el polimorfismo C481T	73
<b>Figura 29.</b> Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas <i>Kpn</i> I (C481T) y <i>Taq</i> I (G590A), para identificar el polimorfismo G590A	73
<b>Figura 30.</b> Digestión con la enzima <i>Kpn</i> I (C481T) y <i>Taq</i> I (G590A)	74
<b>Figura 31.</b> Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas <i>Dde</i> I (A803G) y <i>Hinf</i> I (G857A), para identificar el polimorfismo A803G	76
<b>Figura 32.</b> Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas <i>Dde</i> I (A803G) y <i>Hinf</i> I (G857A), para identificar el polimorfismo G857A	77
<b>Figura 33.</b> Digestión con las enzimas <i>Dde</i> I (A803G) y <i>Hinf</i> I (G857A)	77
<b>Figura 34.</b> Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Kpn</i> I (C481T), para identificar los polimorfismos C282T y C481T	79
<b>Figura 39.</b> Digestión con la enzima <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Kpn</i> I (C481T)	79

## LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	Página
<b>Tabla I.</b> Alelos humanos NAT2	14
<b>Tabla II.</b> Comparación Interétnica del alelo NAT2	19
<b>Tabla III.</b> Efecto del fenotipo acetilador sobre la respuesta y toxicidad de los fármacos	20
<b>Tabla IV.</b> Iniciadores para amplificar los fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb	34
<b>Tabla V.</b> Condiciones de amplificación para los fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb	35
<b>Tabla VI.</b> Programa para la amplificación del fragmento de 866 pb	36
<b>Tabla VII.</b> Programa para la amplificación del fragmento de 578 pb	36
<b>Tabla VIII.</b> Programa para la amplificación de los fragmentos de 141 pb y 119 pb	37
<b>Tabla IX.</b> Enzimas de restricción que digieren el producto amplificado de 866 pb, donde se muestran los fragmentos esperados de los alelos normales y mutados para cada polimorfismo	38
<del><b>Tabla X.</b> Enzima de restricción que digiere el producto amplificado de 141 pb, donde se muestran los fragmentos esperados del alelo normal y mutado para el polimorfismo T341C</del>	<del>39</del>
<b>Tabla XI.</b> Enzima de restricción que digiere el producto amplificado de 119 pb, donde se muestran los fragmentos esperados del alelo normal y mutado para el polimorfismo A803G	39
<b>Tabla XII.</b> Reacción de digestión de la diferentes enzimas de restricción	40
<b>Tabla XIII.</b> Reacción de digestión de las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Msp</i> A1 I	42
<b>Tabla XIV.</b> Fragmentos esperados de los alelos NAT2*5B y NAT2*4	42
<b>Tabla XV.</b> Reacción de digestión de las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Fok</i> I	45
<b>Tabla XVI.</b> Fragmentos esperados de los polimorfismos C481T y C282T	45
<b>Tabla VII.</b> Reacción de digestión de las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Taq</i> I	46

<b>Tabla XVIII.</b> Fragmentos esperados de los polimorfismos C481T y G590A	46
<b>Tabla XIX.</b> Reacción de digestión de las enzimas <i>Dde</i> I y <i>Hinf</i> I	48
<b>Tabla XX.</b> Fragmentos esperados de los polimorfismos A803G y G857A	49
<b>Tabla XXI.</b> Fragmentos esperados de los alelos NAT2*5C y NAT2*4	51
<b>Tabla XXII.</b> Fragmentos esperados de los alelos NAT2*13B y NAT2*4	52
<b>Tabla XXIII.</b> Frecuencia de los polimorfismos en la población de estudio	65
<b>Tabla XXIV.</b> Frecuencia alélica individual y velocidad de acetilación en la población de estudio	80
<b>Tabla XXV.</b> Frecuencia alélica en la población de estudio	83
<b>Tabla XXVI.</b> Modelo bimodal	83
<b>Tabla XXVII.</b> Modelo trimodal	83



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## NOMENCLATURA

### LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
A	Adenina
BSA	Albúmina del suero bovino
C	Citosina
CYP2D6	Debrisoquin hidroxilasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Deoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
g	Gramos
G	Guanina
h	Horas
M	Molar
$\text{MgCl}_2$	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NAT1	arilamina N-acetiltransfera-1
NAT2	arilamina N-acetiltransfera-2
NATP1	Pseudo gen arilamina N-acetiltransfera
NATs	arilaminas N-acetiltransferasas
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
PA	Producto amplificado
PABA	ácido <i>p</i> -aminobenzoico
PAS	ácido <i>p</i> -aminosalicílico
pb	Pares de bases

pBS	Plásmido Blue Script
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pUC	Plásmido
RFLPs	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNPs	Polimorfismo de nucleótido simple
T	Timina
Taq pol	DNA polimerasa de <i>Thermophylus aquaticus</i>
TBE	Buffer compuesto de Trisma base, ácido bórico y EDTA
Tris	Trizma base
TSNT	Triton-SDS-Cloruro de sodio-trizma
V	Voltios
Vol	Volumen
wt	Silvestre
X	Veces la concentración

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Presenta: **Eduardo Belarmino Pérez Medina**

**Título del estudio:** Caracterización del genotipo N-Acetiltransferasa 2 (NAT2) en una muestra de la población del noreste de México

**Introducción:** NAT2 puede activar o inactivar aminas carcinogénicas aromáticas o heterocíclicas y xenobióticos dependiendo del tipo de acetilación: O- acetilación que por lo general activa carcinógenos ambientales y N-acetilación que se considera que los inactiva. Los polimorfismos en este gen pueden afectar la susceptibilidad individual a estos compuestos. Hasta la fecha se han reportado 29 alelos variantes para este gen, cuya presencia varía entre diferentes grupos étnicos, afectando el patrón de acetilación para cada grupo. El patrón de acetilación se puede determinar mediante dos modelos: el bimodal (lento y rápido) y el trimodal (lento, intermedio y rápido). Dependiendo del tipo acetilador lento o rápido, un individuo puede estar predispuesto a cáncer de colon, pulmón, vejiga, cabeza, cuello y mama, y algunas enfermedades como el asma, Parkinson, Alzheimer etc. Esto también afecta la efectividad de algunos fármacos y la toxicidad de diversos xenobióticos.

**Objetivo:** Identificar los alelos variantes de NAT2 presentes en una muestra de la población del noreste de México.

**Metodología:** Se obtuvieron 104 muestras de sangre de sujetos sanos, se les extrajo el DNA. Con tres juegos de iniciadores se amplificaron tres regiones (866 pb, 141 pb y 119 pb) del gen NAT2. Por medio de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs) se identificaron 11 polimorfismos. En el fragmento de 866 pb se detectaron con enzimas de restricción los polimorfismos T111C, G590A y C759T con *Taq I*<sup>α</sup>, G191A y A434C con *Msp I*, C282T con *Fok I*, C481T con *Kpn I*, A845C con *Dra III* y G857A con *Hinf I*. Con el fragmento de 141 pb se detectó el polimorfismo T341C con la enzima *Msp A1 I* y con el fragmento de 119 pb se detectó el polimorfismo A803G con la enzima *Dde I*. Después de identificar todos los polimorfismos en cada individuo, se realizó la genotipificación para asignar los alelos y el tipo de acetilador.

**Resultados:** La tabla a continuación muestra la distribución de los alelos

Tabla 1. Distribución Alélica

Alelos	No	Alelos	No	Alelos	No	Alelos	No
NAT2*4	65	NAT2*5C	5	NAT2*6C	1	NAT2*12A	7
NAT2*5*	2	NAT2*6A	29	NAT2*7A	1	NAT2*12B	1
NAT2*5B	67	NAT2*6B	1	NAT2*7B	24	NAT2*13	3

**Conclusiones:** El tipo acetilador más común es el intermedio (46%), seguido por el lento (40%) y por el rápido (14%). Los alelos más predominantes son NAT2\*5B y NAT2\*4.

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

Cada individuo es único, no solo en su apariencia física y comportamiento, sino también la respuesta al medio ambiente, la susceptibilidad a las enfermedades y la respuesta a fármacos. La variabilidad genética proporciona a una especie la capacidad de adaptarse con el tiempo al medio ambiente y ésto, en la evolución humana, da por resultado varios fenotipos de respuesta ambiental. Por ejemplo, algunos individuos pueden no tolerar el alcohol, mientras que otros muestran una tolerancia considerable. Algunos pueden no responder a medicamentos para el dolor, mientras que otros entran en un sueño profundo con una dosis similar. Algunas personas pueden desarrollar cáncer después de la exposición a químicos peligrosos, mientras que sus colaboradores, con una exposición similar, nunca lo desarrollan. Estas diferencias en susceptibilidad y respuesta pueden a menudo estar ligadas a una capacidad individual variable para metabolizar compuestos tóxicos, o reparar el daño causado por toxinas encontradas en el ambiente. La respuesta a químicos ambientales variará dependiendo de la presencia de cambios en la secuencia del DNA de genes críticos en cada individuo (mutaciones y polimorfismos), mientras que las mutaciones son cambios que generalmente se manifiestan en patologías, los polimorfismos son variaciones en la secuencia nucleotídica que no repercuten en enfermedad obvia. Estos polimorfismos genéticos pueden afectar por lo general sutilmente el nivel de expresión, la estructura, o la actividad catalítica de enzimas metabólicas o reparadoras del DNA, influenciando por lo tanto la susceptibilidad a los tóxicos.<sup>1</sup>

El análisis de los polimorfismos en estos genes puede ser útil para el entendimiento de su distribución en la población, así como para explicar la susceptibilidad, tanto individual como poblacional, a la exposición ambiental a muchos compuestos tóxicos.

## 1.1 Polimorfismos

Los polimorfismos son variaciones en la secuencia de DNA, como sustituciones de nucleótidos, deleciones/inserciones y/o duplicaciones/deleciones del gen. Por definición, un polimorfismo ocurre con una frecuencia en la población mayor del 1%. Estas variaciones pueden o no causar alteraciones en la función de la proteína y el fenotipo. Si un polimorfismo está dentro de la región codificante del gen, puede causar una sustitución aminoacídica, la cual podría provocar un cambio de actividad de la enzima, desde imperceptible hasta muy notable.<sup>2</sup> Un polimorfismo en el promotor puede alterar el nivel de transcripción. Un polimorfismo localizado en el límite intrón/exón en un gen puede producir una proteína incompleta o inactiva como resultado de un empalme (splicing) incorrecto del ARNm. Los polimorfismos que resultan de la sustitución de un solo nucleótido pueden ser sinónimos o no sinónimos, dependiendo del aminoácido implicado en la sustitución, y son llamados polimorfismos de nucleótido simple (SNPs).<sup>1</sup>

Los polimorfismos pueden afectar la susceptibilidad individual a infecciones, la respuesta a la terapia de medicamentos, el consumo de alcohol, el metabolismo de xenobióticos, etc. Hay muchos reportes de subpoblaciones que experimentan un gran efecto terapéutico con dosis de medicamentos estándar debido a su reducida capacidad de inactivar a los medicamentos (por ejemplo acetiladores lentos). Recíprocamente, altas

dosis de medicamentos pueden ser requeridas para observar la respuesta terapéutica para individuos capaces de eliminar rápidamente el medicamento (por ejemplo acetiladores rápidos).<sup>2-6</sup>

## 1.2 Farmacogenética.

La farmacogenética se enfoca en el estudio de los polimorfismos genéticos en enzimas del metabolismo de medicamentos y en cómo éstos se traducen en diferencias heredadas en la respuesta a los fármacos.<sup>7</sup>

La farmacogenética surgió a partir de las observaciones clínicas documentadas inicialmente en la década de 1950, como las que se describen en los siguientes ejemplos:

1) La relación entre la prolongada relajación del músculo después de la administración del sulfametodíum, por una deficiencia heredada de colinesterasa en el plasma. 2) La hemólisis que se presenta después de la terapia antimalaria en algunos individuos, causada por la actividad variable de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en los eritrocitos de estas personas. 3) La neuropatía periférica por isoniazida debida a la herencia de una forma lenta de acetilación de este medicamento.<sup>8</sup>

Las bases moleculares para estas características empezaron a ser elucidadas a finales de la década de 1980, con el inicio de la clonación y caracterización de una región polimórfica de un gen humano que codifica para una enzima metabolizadora de fármacos, la debrisoquin hidroxilasa (CYP2D6).<sup>9</sup>

Recientemente, la importancia clínica de estos polimorfismos genéticos en el metabolismo y eliminación de los fármacos se puso de manifiesto en base a las diferencias fenotípicas observadas entre individuos en la población, como diversas reacciones adversas a medicamentos.<sup>10</sup> Por ejemplo: 1) la severa y potencialmente fatal

toxicidad hematopoyética que ocurre cuando pacientes deficientes de la tiopurina metiltransferasa, son tratados con dosis estándar de azatioprina o mercaptopurina,<sup>11</sup> 2) el fenotipo acetilador lento que ha sido asociado a lupus inducido por hidralazina, neuropatía inducida por isoniazida, cáncer de vejiga asociado a colorantes y reacciones de hipersensibilidad inducida por sulfonamida.<sup>12,13</sup> Con los recientes avances en la tecnología de secuenciación de DNA, los polimorfismos genéticos (como los polimorfismos de nucleótido simple o SNPs, por su siglas en inglés) pueden ser inicialmente detectados y mediante estudios clínicos evaluados para determinar si tienen o no consecuencias en la salud de los pacientes. Estos polimorfismos pueden o no tener una importancia clínica clara para incidir en la prescripción de medicamentos, dependiendo de: 1) la alteración que el polimorfismo cause en la molécula afectada, 2) la expresión de otras enzimas que metabolizan fármacos en el paciente, 3) la presencia de medicación concurrente o enfermedad, y 4) otras características clínicas poligenéticas que impacten en la respuesta a los medicamentos.<sup>8</sup>

El estudio de la farmacogenética puede permitir el desarrollo de agentes terapéuticos con destinos específicos, para subgrupos de la población genéticamente identificables. Esto representa un cambio en la estrategia tradicional de experimentos para el desarrollo de nuevos medicamentos, de manera que se obtengan compuestos que sean seguros y efectivos para cada miembro de la población.<sup>8</sup>

### **1.3 Genómica ambiental**

El objetivo de la genómica ambiental es entender como la variabilidad genética influye sobre la respuesta individual a los efectos del medio ambiente. Se basa en la suposición de que los individuos portadores de un determinado genotipo acumulan más

daño y por lo tanto están más predispuestos a desarrollar enfermedades relacionadas a la exposición de algún compuesto que los individuos portadores de otro genotipo.<sup>1</sup>

Determinar de qué manera la variación genética entre los individuos impacta sobre las interacciones de complejos multigénicos de enzimas que participan en la biotransformación de fármacos, involucrando numerosas vías metabólicas paralelas o sobrelapadas, representa un enorme desafío científico.

### 1.3.1 Variación en la respuesta ambiental genética

La selección natural provee un medio para adaptar a los seres vivos al medio ambiente (por ejemplo: clima, alimento, depredación) y por lo tanto a sobrevivir. Es muy grande el número de genes del metabolismo que exhiben polimorfismos funcionales, sugiriendo que la presencia de este grado de variación fue ventajosa para la población humana en el pasado. Mientras que las enzimas que metabolizan xenobióticos pueden convertir muchos compuestos tóxicos en compuestos aprovechables

(especialmente en plantas) o en metabolitos no tóxicos, también es evidente que algunos metabolitos no tóxicos son convertidos a compuestos tóxicos por las mismas enzimas.

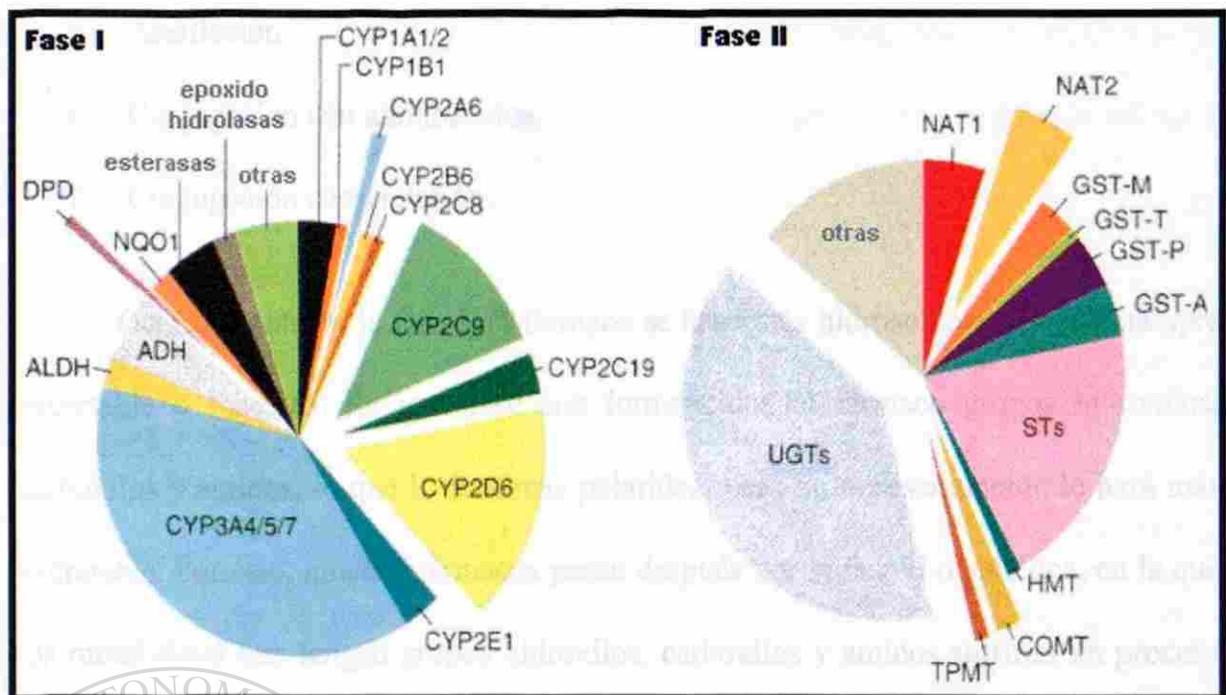
Así como existen polimorfismos funcionales, hay una alta frecuencia de alelos no funcionales, y también de alelos altamente inducibles (o de muy alta actividad) entre las enzimas que metabolizan xenobióticos, sugiriendo que la presión de selección los está manteniendo en la población humana. Es decir, en algún momento del tiempo fue una ventaja para sobrevivir tener cierta vía metabólica bloqueada o disminuida. Mientras que en algún otro tiempo o lugar fue ventajoso tenerla muy activa. Presumiblemente esta es la razón por la que ambos tipos de alelos son relativamente comunes en la población humana.<sup>1</sup>

#### 1.4 Presión de selección ocupacional

La exposición de trabajadores a compuestos tóxicos puede causar una presión de selección ocupacional contra individuos que tienen una herencia de genes del metabolismo no favorables.<sup>14</sup> Estudios que involucran grandes poblaciones, sugieren que trabajadores con susceptibilidad genética para toxicidad de agentes peligrosos, pueden verse forzados a cambiar de trabajo por enfermedad y ausentismo del trabajo. Como resultado, la fuerza de trabajo que permanece puede consistir de individuos que tienen genotipos resistentes. Esto puede proporcionar las bases genéticas para explicar el bien documentado “efecto del trabajador saludable”, el cual indica que los trabajadores con exposición a agentes peligrosos tienen en conjunto un rango de mortalidad menor que la población general expuesta a esos mismos agentes. Quizás el efecto del trabajador saludable es un disfraz no intencional y desafortunado para algunas condiciones de trabajo peligroso.<sup>15</sup>

#### 1.5 Clasificación de enzimas por su mecanismo de acción

Existen diversas enzimas metabolizadoras de fármacos muy bien conocidas que catalizan la activación y destoxificación de xenobióticos<sup>16</sup> y son clasificadas como enzimas de la fase I o II, respectivamente. Los miembros de la primera fase incluyen a enzimas relacionadas a citocromo P-450 y epóxido hidrolasas. Las de la segunda fase son las N-Acetiltransferasas, Glutathion S-transferasa, UDP-glucuronosiltransferasa y sulfotransferasa (Figura 1).



**Figura 1.** Enzimas de las Fases I y II. Las enzimas de la fase I transforman a los fármacos mediante la introducción de grupos funcionales, mientras que las enzimas de la fase II conjugan al fármaco con una sustancia endógena. Todas estas enzimas tienen polimorfismos asociados con cambios en el metabolismo de los fármacos. ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; CYP, citocromo P450, DPD, dihidropirimidina deshidrogenasa; NQO1, NADPH:quinona oxidoreductasa o DT diaforasa; COMT, catecol O-metiltransferasa; GST, glutatión S-transferasa; HMT, histamina metiltransferasa; NAT, N-acetiltransferasa; STs, sulfotransferasas; TPMT, tiopurina metiltransferasa; UGTs, uridina 5'-trifosfato glucuronosiltransferasas.<sup>8</sup>

El proceso de biotransformación consta de varias reacciones químicas, las que se

pueden agrupar en:

1. **Fase I o no sintética:** esta es la primera etapa de transformación. En esta fase están presente a su vez los procesos de :
  - a. Oxidación
  - b. Hidrólisis
  - c. Reducción
2. **Fase II o sintética:** representadas fundamentalmente por reacciones de conjugación:
  - a. Glucuronidación.
  - b. Sulfatación.
  - c. Metilación.

- d. Acetilación.
- e. Conjugación con aminoácidos.
- f. Conjugación con glutatión.

Generalmente en la fase I, el fármaco se hace más hidrosoluble pero no siempre excretable o inactivo. En esta fase son introducidos al fármaco grupos hidroxilos, carboxilos y aminos, lo que le dará más polaridad, pero no necesariamente lo hará más excretable. Por ésto, muchos fármacos pasan después por la fase II o sintética, en la que los metabolitos que tengan grupos hidroxilos, carboxilos y aminos sufrirán un proceso de conjugación (realizado por las transferasas), que consiste en la unión del fármaco con una sustancia endógena, de tal forma que se producirá un metabolito de mayor peso molecular, hidrosoluble y generalmente inactivo.<sup>17</sup>

La actividad tanto absoluta como relativa de las enzimas de la fase I y II difiere entre individuos y afecta la respuesta biológica a la exposición a xenobióticos.<sup>19</sup>

Diversas reacciones adversas a los medicamentos y la susceptibilidad al cáncer tienden a ser atribuidas a la diferencia interindividual en la actividad de las enzimas de las fases I y II.<sup>19,20</sup>

### 1.6 N-Acetiltransferasas

Las arilamina N-acetiltransferasas (NATs) son encontradas en todas las especies desde bacterias hasta humanos. Ellas catalizan la transferencia del grupo acetil de la acetilcoenzima A, a una amina aromática, heterocíclica o compuestos de hidracina. En humanos, la acetilación es la mejor ruta de biotransformación para muchos fármacos de arilaminas e hidracina, así como para un gran número de carcinógenos conocidos presentes en la dieta, el humo del cigarro y el ambiente.<sup>21-24</sup> La reacción es catalizada

por dos acetiltransferasas citoplasmáticas, la N-acetiltransferasa tipo I (NAT1) y la N-acetiltransferasa tipo II (NAT2). Estas arilamina N-Acetiltransferasas pueden activar o inactivar las aminas carcinógenas aromáticas o heterocíclicas, dependiendo del tipo específico de acetilación que ocurra. La N-Acetilación de moléculas es típicamente una reacción de detoxificación, mientras la O-Acetilación puede producir especies reactivas.<sup>13,25-27</sup>

Ohsako and Deguchi aislaron el transcrito para cada gen (NAT1 y NAT2) de una librería de DNAC de hígado humano en 1990.<sup>28</sup> La secuenciación de NAT1 y NAT2 reveló un número de alelos variantes que afectan la actividad de ambos genes in vivo.<sup>29</sup> Estos alelos pueden causar variación en la capacidad individual para la N-Acetilación, afectando así la susceptibilidad individual a toxinas ambientales.<sup>13,25-27</sup>

Variaciones en los niveles de actividad de NAT1<sup>30</sup> y el fenotipo acetilador rápido y lento de NAT2 han sido reportadas.<sup>13,25-27</sup> Se cree que la actividad de N-Acetiltransferasa está principalmente bajo el control genético, aunque la variación en actividad que se ha atribuido a factores ambientales no ha sido completamente examinada.<sup>31,32</sup>

### 1.6.1 La familia del gen arilamina N-acetiltransferasa

A la fecha, 22 genes relacionados a NAT han sido identificados en 14 diferentes especies de procariotes y eucariotes; aunque han sido relacionados genes adicionales, descubiertos en otros genomas que se han secuenciado. La región codificante de los genes invariablemente carece de intrones, codificando una proteína de 254 a 332 aminoácidos. Una región altamente conservada está en el extremo amino terminal, mientras que el extremo carboxilo terminal muestra muy poca conservación entre

especies. Todas las NATs poseen una cisteína, una histidina y un aspartato conservados que tienden a estar implicados en la formación de una triada catalítica.<sup>33</sup> Estudios de inhibición<sup>34</sup> y mutagénesis sitio dirigidas<sup>35</sup> tienden a confirmar que la cisteína (Cis68 en la proteína humana) es crucial para la actividad de NAT.

### 1.6.2 Características estructurales de las proteínas NAT

La primera estructura cristalina obtenida de la proteína NAT fue la de la bacteria *Salmonella typhimurium*. Ésta reveló muchas características sorprendentes que proveen un estructura nueva e información funcional acerca de la enzima, específicamente una triada catalítica formada por cisteína-histidina-aspartato que fue identificada en la región N-terminal de la proteína.<sup>33</sup> Basados sobre el análisis funcional, la proteína ha sido dividida en tres dominios. El primero consiste de un lazo helicoidal localizado desde el residuo aminoacídico 1 hasta aproximadamente el 90, el cual forma un lado de la hendidura en la cual está involucrada la cisteína en la transferencia de residuos acetil.

Todas las NATs son altamente homólogas en esta región. El segundo dominio consiste aproximadamente de los residuos aminoacídicos 90 a 210 y está localizado sobre el otro lado de la hendidura. Éste consiste principalmente de estructuras  $\beta$ -plegadas. El último dominio está en la región carboxilo terminal, es una combinación de  $\beta$ -plegadas y  $\alpha$ -hélices, y muestra una gran diversidad entre especies. Las características estructurales alrededor de la triada son similares a la superfamilia de proteasas de cisteína, la cual incluye proteínas como las transglutaminasas, catepsinas y caspasas. Mientras estas proteínas tradicionalmente catalizan la hidrólisis de sustratos de amidas, las NAT y las transglutaminasas catalizan la transferencia de un acil que resulta en la formación de un enlace amida.<sup>29</sup>

### 1.6.3 Mecanismo de acción y especificidad de sustrato

Las arilaminas N-acetiltransferasas difieren de muchas otras transferasas dependientes de acetil coenzima A presentes en las células, por su mecanismo de reacción ping-pong bi bi.<sup>36,37</sup> La reacción toma lugar en dos pasos separados. Inicialmente, se une la acetil coenzima A a la enzima y el acetil es transferido del cofactor a la cisteína (cis68 para la isoforma humana) de la proteína, la coenzima A es entonces liberada. El segundo paso involucra la unión del sustrato a la enzima acetilada, lo cual es seguido de la transferencia del acetil al sustrato. Finalmente, el producto acetilado es liberado de la enzima. El primer paso de la reacción puede proceder en ausencia del sustrato.<sup>38</sup>

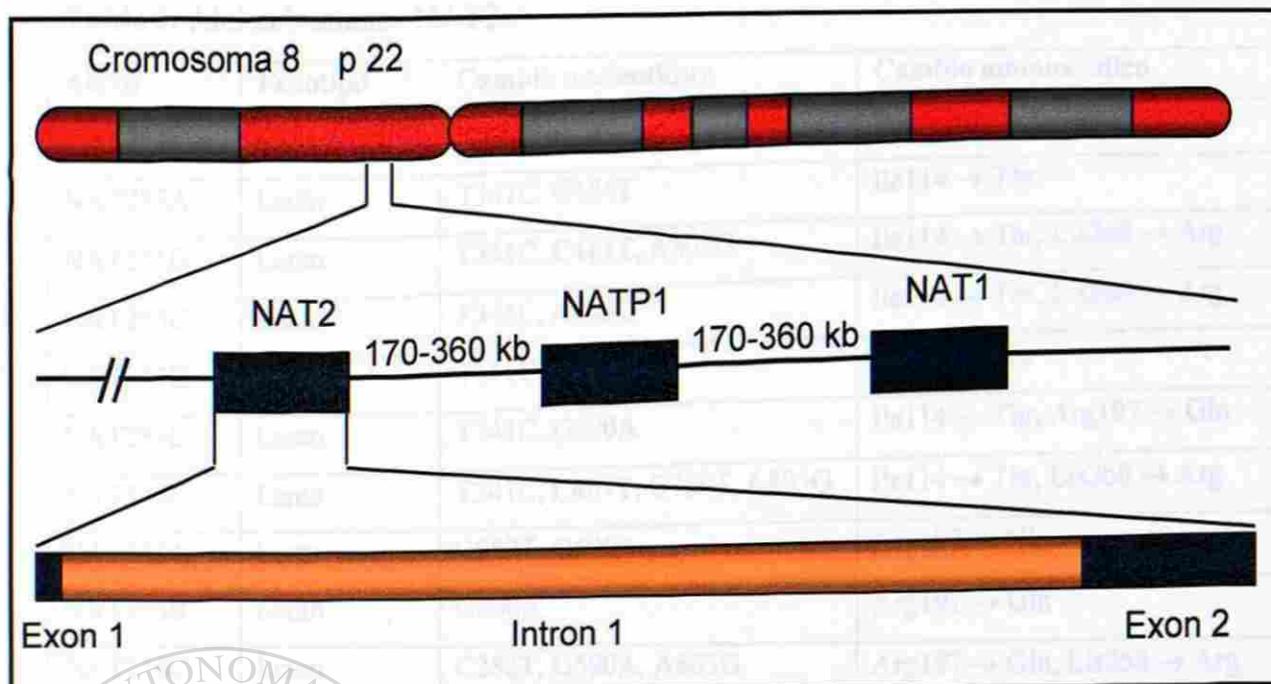
No está clara la modificación estructural que determina la especificidad de sustrato para las diferentes isoformas de NAT. En general, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), *p*-aminobenzoil glutamato y ácido *p*-aminosalicílico (PAS) son considerados sustratos específicos para la NAT1 humana (o NAT2 en el ratón). Estos sustratos se caracterizan por la presencia de sustituciones relativamente pequeñas en la posición *para* del anillo aromático. Por el contrario, los sustratos sulfametazina, procainamida y dapsona son principalmente acetilados por la NAT2 humana. Algunos compuestos como 2-aminofluoreno son excelentes sustratos para ambas.<sup>23</sup>

### 1.6.4 Localización del gen, estructura y expresión

Dos isoenzimas NAT se han identificado en humanos, llamadas NAT1 y NAT2, las cuales son productos de distintos loci genéticos designados NAT1 y NAT2, respectivamente.<sup>39</sup> Un pseudogen relacionado, NATP1, también ha sido identificado,<sup>39</sup> el cual contiene múltiples marcos de lectura y mutaciones sin sentido. Los dos genes

funcionales fueron inicialmente aislados en 1989 por Grant y cols., quienes observaron que cada uno carecía de intrones, con un marco de lectura abierto de 870 pb.<sup>40</sup> Las NATs comparten una similitud nucleotídica del 87%, la cual se traduce en una identidad aminoacídica del 81%. Mientras que el transcrito entero de NAT1 es derivado de un solo exón, el transcrito de NAT2 es derivado de un exón que codifica la proteína junto con un segundo exón no codificante de 100 pb localizado a unos 8 kb río arriba del sitio de inicio de la traducción.<sup>39,41</sup> Los genes están localizados en el brazo corto del cromosoma 8, más específicamente en la región 8p22,<sup>26</sup> la cual está comúnmente deletada en humanos con cáncer.<sup>42-46</sup> NAT1 y NAT2 se expresan de una manera codominante autosómica.<sup>39,47,48</sup> Los loci NAT están separados por solo 170-360 kb y están en una orientación NAT1→NATP1→NAT2. NAT1 inicia sobre el sitio centromérico del marcador D8S261 y NAT2 coincide con el marcador D8S21<sup>41</sup> (Figura 2). Ambos genes NAT1 y NAT2 muestran una pronunciada variación alélica, con 26 diferentes NAT1 humanas y 29 diferentes alelos NAT2 humanos identificados hasta la fecha.<sup>49</sup> El locus NAT2 tiene alelos que contienen desde una hasta cuatro SNPs.<sup>50</sup>

Generalmente, la sustitución de un nucleótido simple en NAT2 resulta en una baja actividad, disminución de la expresión e inestabilidad de la enzima.<sup>51</sup>



**Figura 2.** Localización del gen NAT2. Los loci NAT están separados por solo 170-360 kb y en una orientación NAT1→NATP1→NAT2 del centrómero al extremo del cromosoma. NAT2 es derivado de un exón (exón 2) que codifica la proteína junto con otro exón (exón 1) de 100 pb localizado a unos 8 kb río arriba del sitio de inicio de la traducción. El segundo exón del gen NAT2 tiene un marco de lectura abierto de 870 pb.

### 1.6.5 Alelos NAT2 Humanos

Desde que el locus NAT2 humano fue establecido como el sitio clásico de polimorfismos responsables de la acetilación,<sup>13,52</sup> el estudio de la variación alélica de NAT2 ha sido un área de intensa investigación. Hasta la fecha, 29 diferentes alelos NAT2 han sido detectados en la población humana (Tabla I).<sup>49,53,54</sup>

Cada uno de los alelos variantes se distingue por una a cuatro sustituciones nucleotídicas, de las cuales 13 han sido identificadas y localizadas en el exón que codifica la enzima. Nueve de estas producen cambios aminoacídicos (C190T, G191A, T341C, A434C, G499A, G590A, A803G, A845C, G857A), mientras que cuatro son silenciosas (T111C, C282T, C481T, C759T).

**Tabla I. Alelos humanos NAT2.**

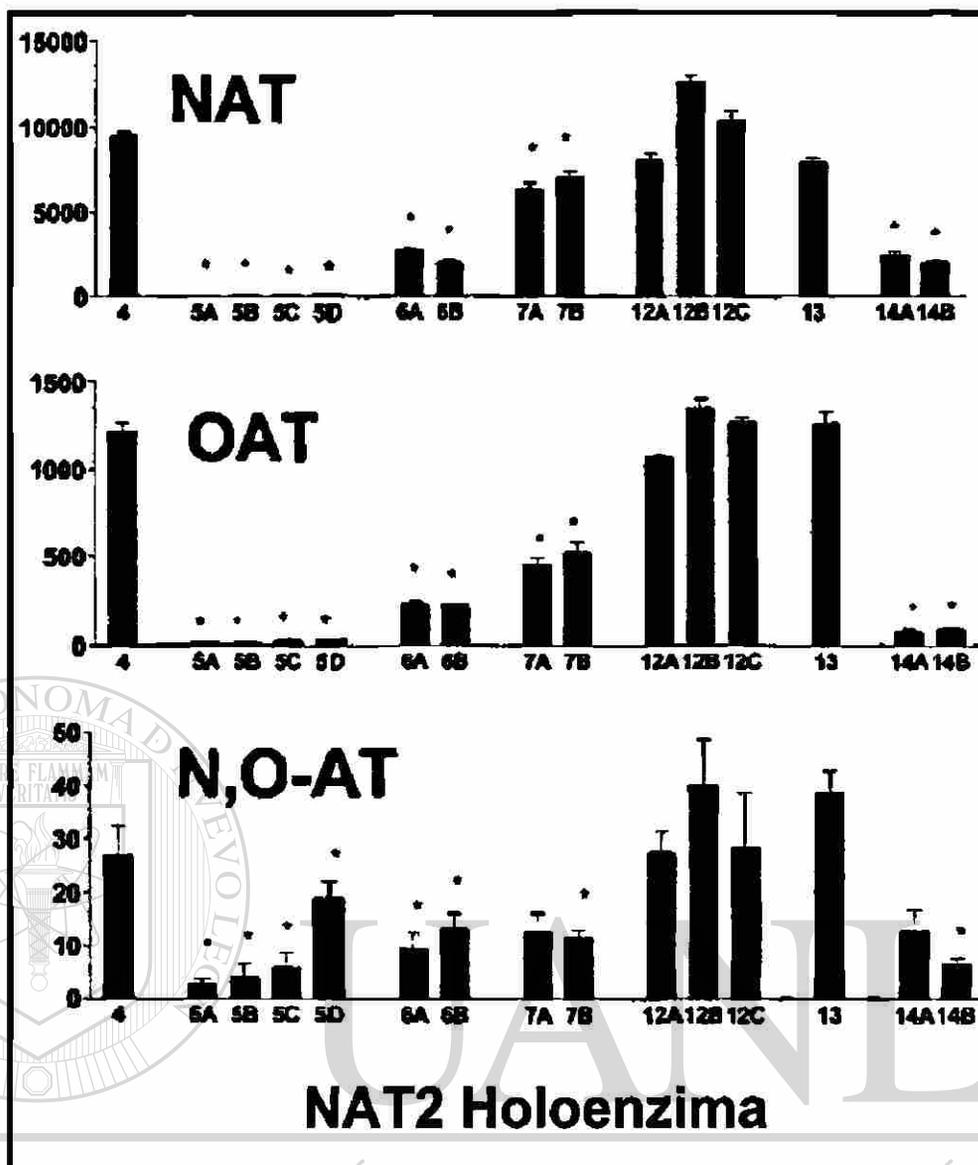
<b>Alelos</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Cambio nucleotídico</b>	<b>Cambio aminoacídico</b>
NAT2*4	Rápido	Ninguno	Ninguno
NAT2*5A	Lento	T341C, C481T	Ile114 → Thr
NAT2*5B	Lento	T341C, C481T, A803G	Ile114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*5C	Lento	T341C, A803G	Ile114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*5D	Lento	T341C	Ile114 → Thr
NAT2*5E	Lento	T341C, G590A	Ile114 → Thr, Arg197 → Gln
NAT2*5F	Lento	T341C, C481T, C759T, A803G	Ile114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*6A	Lento	C282T, G590A	Arg197 → Gln
NAT2*6B	Lento	G590A	Arg197 → Gln
NAT2*6C	Lento	C282T, G590A, A803G	Arg197 → Gln, Lis268 → Arg
NAT2*6D	Lento	T111C, C282T, G590A	Arg197 → Gln
NAT2*7A	Lento	G857A	Lis286 → Glu
NAT2*7B	Lento	C282T, G857A	Lis286 → Glu
NAT2*10	No se sabe	G499A	Glu167 → Lis
NAT2*11	No se sabe	C481T	Ninguno
NAT2*12A	Rápido	A803G	Lis268 → Arg
NAT2*12B	Rápido	C282T, A803G	Lis268 → Arg
NAT2*12C	Rápido	C481T, A803G	Lis268 → Arg
NAT2*13	Rápido	C282T	Ninguno
NAT2*14A	Lento	G191A	Arg64 → Gln
NAT2*14B	Lento	G191A, C282T	Arg64 → Gln
NAT2*14C	Lento	G191A, T341C, C481T, A803G	Arg64 → Gln, Ile114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*14D	Lento	G191A, C282T, G590A	Arg64 → Gln, Arg197 → Gln
NAT2*14E	Lento	G191A, A803G	Arg64 → Gln, Lis268 → Arg
NAT2*14F	Lento	G191A, T341C, A803G	Arg64 → Gln, Ile114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*14G	Lento	G191A, C282T, A803G	Arg64 → Gln, Lis268 → Arg
NAT2*17	Lento	A434C	Gln145 → Pro
NAT2*18	No se sabe	A845C	Lis282 → Thr
NAT2*19	Lento	C190T	Arg64 → Trp

Diversos estudios han sido realizados para mostrar claramente la correlación entre el genotipo NAT2 y el fenotipo.<sup>26,27</sup> Al inicio, los estudios de genotipificación investigaban la presencia de los polimorfismos C481T (M1), G590A (M2), G857A (M3) y algunas veces G191A (M4), los cuales causan un fenotipo acetilador lento que tiene un efecto dosis-gen. Los individuos que fueron homocigotos para los polimorfismos en NAT2 tienen un fenotipo acetilador lento, mientras que los individuos heterocigotos tienen un fenotipo acetilador intermedio, y los individuos que carecen de los cuatro polimorfismos en NAT2 antes mencionados, tienen un fenotipo acetilador rápido. El método de genotipificación para los polimorfismos Wt, M1, M2, M3 y M4 solo identifica a un subgrupo de alelos variantes encontrados en la población humana, lo cual podría prestarse a una mala clasificación y por lo tanto a una equivocada deducción del fenotipo.<sup>55</sup>

Estudios realizados en tejido hepático sugirieron que el fenotipo acetilador lento se asociaba con la presencia de ciertas sustituciones nucleotídicas en la región codificante de la proteína del gen NAT2, debido a una marcada disminución en la concentración de la proteína NAT2, mientras que los niveles de RNAm de NAT2 permanecían sin cambios.<sup>56</sup> Hein y colaboradores<sup>57</sup> realizaron un estudio integral para evaluar la capacidad de acetilación de 16 diferentes alelos NAT2 en un sistema de expresión bacteriano. De las siete sustituciones específicas de NAT2 que ellos examinaron, las sustituciones T341C, G590A, G857A y G191A producen holoenzimas NAT2 recombinantes con reducida capacidad de acetilación, mientras que las sustituciones C481T, C282T y A803G producen holoenzimas NAT2 recombinantes con capacidad de acetilación similar a la proteína silvestre NAT2\*4. Como resultado, los alelos NAT2 que contienen cualquiera de las sustituciones específicas que producen

holoenzimas recombinantes NAT2 con capacidad de acetilación reducida, han sido asociadas con un fenotipo acetilador lento, e incluyen NAT2\*5, NAT2\*6, NAT2\*7, NAT2\*14 y NAT2\*17 (Tabla I) (Figura 3). Los alelos con las sustituciones específicas que producen holoenzimas NAT2 recombinantes con una actividad catalítica de N-,O-, y N,O-acetiltransferasa a niveles comparables al acetilador rápido NAT2\*4, se asocian a un fenotipo acetilador rápido e incluye NAT2\*12 y NAT2\*13 (Tabla I) (Figura 3). Por lo tanto, como se ve en la figura 3 la actividad de acetilación *in vitro* es clasificada como sigue: NAT2\*12 = NAT2\*13 = NAT2\*4 > NAT2\*7 > NAT2\*6 > NAT2\*14 > NAT2\*5.

El mecanismo molecular responsable de la producción del fenotipo acetilador lento no está bien entendido hasta la fecha. Algunos cambios de bases aparentemente causan un fenotipo acetilador lento debido a la producción de una proteína inestable. Las holoenzimas NAT2 codificadas por alelos con sustituciones de bases en las posiciones 191, 590 o 857 se encontraron significativamente más inestables en un sistema de expresión bacteriano que la proteína silvestre.<sup>51,54,58</sup> Sin embargo, en estos estudios acerca de la cantidad de proteína NAT2 inmunodetectable, no se observó una diferencia significativa en el aumento de expresión de los alelos variantes y silvestre. Esto contrasta con las observaciones de Grant y cols<sup>56</sup> quienes mostraron que en el hígado humano, el contenido de NAT2 está considerablemente reducido en acetiladores lentos, sugiriendo que el ambiente artificial del sistema de expresión bacteriano no puede reflejar adecuadamente lo que ocurre en la células de mamíferos, con la estimación de la degradación de proteínas.



**Figura 3.** Actividad catalítica de NAT2. Capacidad relativa de las holoenzimas recombinantes N-acetiltransferasas humanas para catalizar la N-acetilación de 2-aminofluoreno (arriba), la O-acetilación de N-hidroxy-2-aminofluoreno (centro) y la N,O-acetilación de N-hidroxi-N-acetil-2-aminofluoreno (abajo). Los niveles de acetiltransferasa para cada holoenzima fueron N-acetilación > O-acetilación > N,O-acetilación. \*, significativamente menor actividad que NAT2\*4 ( $P < 0.05$ ). La actividad de NAT2 es expresada en pmol/min/unidad de proteína; la actividad de OAT y N,O-AT es expresada en pmol/min/mg ADN/unidad de proteína.<sup>55</sup>

En un estudio realizado por Leff y cols.<sup>59</sup> se caracterizaron diferentes alelos NAT2 humanos en un sistema de expresión en levaduras. Ellos encontraron tres nuevos alelos, llamados NAT2\*5D (T341C), NAT2\*14G (G191A, C282T y G590A) y

NAT2\*6D (C111T, C282T y G590A), que expresaron proteínas que tenían capacidades similares de N- y O-acetilación a la que comúnmente produce el alelo lento NAT2\*5B, y significativamente menor que la del alelo silvestre NAT2. La expresión de NAT2\*5B y NAT2\*5D se encontró que era significativamente menor que el de la proteína silvestre, sugiriendo que la sustitución de base en la posición 341, la cual es común en los alelos NAT2\*5, es suficiente para la reducción en la expresión de la proteína NAT2. Esto no se encontró en el caso de NAT2\*6D y NAT2\*14G, las cuales fueron expresadas a niveles comparables al tipo silvestre. En contraste, se encontró que NAT2\*6D y NAT2\*14G eran significativamente menos estables que el tipo silvestre.

### **1.6.6 Frecuencia del fenotipo acetilador**

La frecuencia del fenotipo acetilador lento varía considerablemente entre grupos étnicos,<sup>60</sup> y esto es debido a las diferentes frecuencias de los polimorfismos que corresponden a los alelos acetiladores lentos.

Aproximadamente la mitad de los que tienen ancestros europeos heredan dos alelos de NAT2 que se caracterizan por una actividad de acetilación reducida.<sup>27,61</sup> En la población caucásica y africana la frecuencia del fenotipo acetilador lento varía entre 40 y 70%, mientras que en la población asiática, como Japoneses, Chinos, Coreanos y Tailandeses, el rango es de 10 a 30% (Tabla II).<sup>62</sup>

### **1.6.7 Patrón de Acetilación**

Un amplio rango de actividad de N-Acetilación es observada en humanos y ha sido bien caracterizada por algunos autores como una distribución bimodal y por otros como una trimodal.<sup>50</sup> El modelo bimodal clasifica a los individuos en acetiladores

rápidos y lentos, y en el modelo trimodal, los individuos son clasificados en acetiladores rápidos, intermedios y lentos.

**Tabla II.** Comparación Interétnica del alelo NAT2

Grupos étnicos	No de individuos analizados	Alelo acetilador rápido (%) NAT2*4 (wt)	Alelo acetilador lento (%)			
			NAT2*5 A/B/C	NAT2*6 A/B	NAT2*7 A/B	NAT2*14 A/B
Blancos, EU	421	24	43	31	2	0
Blancos, Europeos	434	26	46	26	2	0
Blancos, Españoles	504	22	44	26	1	1
Afroamericanos	214	35	30	23	5	8
Africanos	102	27	40	22	2	9
Hispanos	148	40	28	18	14	1
Japoneses	224	67	1	22	10	0
Chinos	254	53	5	30	12	0
Coreanos	85	68	2	18	11	1
Filipinos	100	40	7	36	18	0
Aborígenes (Australia)	49	41	2	17	40	---
Indios Americanos						
Ngawbe	71	74	2	0	24	0
Embera	101	65	10	4	21	0

Tomado de la referencia #62

### 1.6.8 NAT y la respuesta a los fármacos

Los polimorfismos genéticos en la actividad de la N-acetiltransferasa fueron inicialmente descubiertos en pacientes con tuberculosis tratados con isoniazida.<sup>63</sup> Este fármaco es principalmente excretado después de la acetilación catalizada por NAT2. Desde entonces, se han descrito para muchos agentes terapéuticos sus propios polimorfismos de acetilación en humanos. Estos incluyen hidralazina, procainamida, sulfametazina, endralazina, sulfonamidas, nitrazepam y dapsona. Sin embargo, la incidencia de fracaso o respuesta clínica menos efectiva como consecuencia de polimorfismos en la acetilación no es común. Esto es porque muchos fármacos que son

metabolizados por las NATs tienen una amplia ventana terapéutica o porque la acetilación es una vía metabólica menor. Una excepción es la hidralazina. Los primeros estudios mostraron que la actividad antihipertensiva de la hidralazina era menor en acetiladores rápidos y que era necesaria una dosis 40% más alta para igualar el efecto terapéutico comparado con los acetiladores lentos.<sup>5</sup> Esta diferencia aparentemente se debe al cambio en la biodisponibilidad del fármaco, el cual decrece de 33% en acetiladores lentos, a menos de un 10% en acetiladores rápidos.

La consecuencia más común de los polimorfismos que afectan la acetilación de los agentes terapéuticos es un incremento en la frecuencia y severidad de los efectos adversos que pueden presentarse en ambos fenotipos (Tabla III).

**Tabla III.** Efecto del fenotipo acetilador sobre la respuesta y toxicidad de los fármacos.

Medicamento	Fenotipo	Efecto
Dapsona	Lento	Neurotoxicidad
Sulfametoxazol	Lento	Hipersensibilidad
Hidralazina	Lento	Lupus eritematoso sistémico
	Rápido	Decremento en el efecto terapéutico
Isoniazida	Lento	Neuropatía
	Lento	Hepatotoxicidad
Cotrimoxazol	Lento	Varias reacciones adversas
Sulfasalazina	Lento	Variada toxicidad
	Lento	Hepatotoxicidad
	Lento	Nausea/Vomito
Amonafida	Rápido	Leucopenia
Procainamida	Lento	Lupus eritematoso sistémico
Fenelzina	Rápido	Decremento en el efecto terapéutico
<i>p</i> -Fenilenediamina	Lento	Dermatitis por contacto

Tomado de la referencia #29

Los efectos adversos frecuentemente se originan como resultado de una modificación en la vía metabólica responsable de la activación y/o detoxificación de los fármacos. Esto se ha observado para las sulfonamidas que contienen una amina, como el

sulfometoxazol, que sufre una hidroxilación para transformarse en un metabolito N-hidroxi reactivo capaz de unirse covalentemente a macromoléculas, dando como resultado reacciones idiosincrásicas adversas.<sup>64</sup> Las sulfonamidas pueden también ser acetilados por NAT2 para formar un metabolito no reactivo N-acetil. En los acetiladores lentos, una alta proporción del fármaco es N-hidroxilado y consecuentemente, estos individuos están altamente predispuestos a la toxicidad inducida por sulfonamidas.<sup>65-67</sup> Sin embargo, como señaló Spielberg, la incidencia de efectos adversos de las sulfonamidas es mucho menor que la incidencia del fenotipo acetilador lento, sugiriendo que otros factores participan disminuyendo las reacciones idiosincrásicas adversas.<sup>64</sup>

La predisposición a desarrollar efectos colaterales, como neurotoxicidad o anemia hemolítica, debido a la terapia con dapsona es muy similar a la que se describió para las sulfonamidas.<sup>68</sup> El índice más severo de toxicidad ocurre en individuos con un fenotipo acetilador lento, quienes son hidroxiladores rápidos, lo cual es consistente con el papel que tiene cada vía en la activación o detoxificación de los fármacos.<sup>69</sup>

Mientras que los acetiladores lentos están altamente predispuestos a la toxicidad de sulfonamidas y dapsona, otros agentes terapéuticos exhiben una incidencia incrementada de reacciones adversas en acetiladores rápidos. Amonafida es una nueva arilamina que ha sido previamente usada en pruebas clínicas para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Este compuesto sufre una N-acetilación convirtiéndose en un metabolito activo que contribuye a una toxicidad sistémica. Diversos estudios muestran que la mielosupresión es mayor en acetiladores rápidos (células blancas = 500/ $\mu$ l) comparado con las acetiladores lentos (células blancas = 3,400/ $\mu$ l) después de una dosis

estándar de 300 mg/m<sup>2</sup> diariamente por 5 días.<sup>70-72</sup> Debido a esto se han recomendado diferentes dosis para los dos grupos.<sup>71,73</sup>

El reciente descubrimiento y clonación de NATs procarióticas ha sugerido la posibilidad de que el metabolismo bacteriano sobre los fármacos y otros xenobióticos puede contribuir a su eficiencia terapéutica y toxicológica in vivo.<sup>74,75</sup> Payton y cols. demostraron que *M. smegmatis* con el gen NAT de *M. tuberculosis* tiene una resistencia tres veces mayor a la isoniazida debido a un incremento en la acetilación del fármaco.<sup>74</sup> Estas observaciones sugieren que el nivel de expresión de NAT en la bacteria blanco puede ser un importante modificador terapéutico para antibióticos que son principalmente acetilados. Además, polimorfismos en los genes NAT bacterianos pueden dar diferentes respuestas terapéuticas.

Okumura y cols.<sup>76</sup> encontraron que los metabolitos acetilados de muchas arilaminas como la ácido *p*-aminobenzoico 4-aminobifenil y 1-aminopireno se excretaron en la orina y heces de perros que carecen de la actividad N-acetiltransferasa.<sup>77</sup> Ellos demostraron que la microflora intestinal fue responsable de la formación de los derivados acetilo. De la misma manera, la microflora presente en el intestino de ratas contribuyó a la acetilación de 2-nitrofluoreno y a la formación de aductos en el DNA en hígado, riñón, pulmón y corazón, después de la administración oral.<sup>78</sup> Estos resultados sugieren que las NATs bacterianas tienen un papel en la activación y destoxicación de xenobióticos en el organismo huésped y pueden jugar un papel importante en el metabolismo de fármacos anti-inflamatorios, como el ácido 5-aminosalicílico.<sup>75</sup>

### 1.6.9 NAT2 y enfermedades

La asociación entre el estado acetilador y la predisposición a varias enfermedades ha sido reportada extensamente. La predisposición a diferentes enfermedades puede asociarse tanto en fenotipos lentos o rápidos. Esto ha sido observado para cáncer de vejiga, colon y mama, lupus eritematoso sistémico, diabetes, enfermedad de Gilbert, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer.<sup>29</sup> Estas asociaciones implican una participación de factores ambientales que son metabolizados por los NATs, en particular por NAT2, en cada enfermedad. Sin embargo, es difícil llevar a cabo la identificación de estos factores. Los humanos están expuestos a muchos substratos tóxicos de NAT, incluyendo las aminas heterocíclicas derivadas de los alimentos presentes en la dieta, así como también las arilaminas 4-aminobifenil y  $\beta$ -naftilamina presentes en el humo del tabaco.<sup>79-82</sup> Además de la exposición ocupacional a arilaminas carcinógenas como la benzidina, lo que también ha sido reportado.<sup>83,84</sup>

Debido a la función de la acetilación en el metabolismo de activación y/o detoxificación de arilamina y carcinógenos heterocíclicos, el estado acetilador y la predisposición al cáncer han sido ampliamente investigadas. A diferencia de los raros casos de genes involucrados en cánceres familiares con alta probabilidad de causar la enfermedad, los genes responsables de los polimorfismos metabólicos tienen una baja probabilidad de causar la enfermedad y causan solo un incremento moderado en la predisposición del cáncer. No obstante, su amplia presencia en la población general sugiere que ellos contribuyen de manera significativa para la predisposición individual. En 1979, Lower y cols.<sup>85</sup> hicieron la primera demostración de una asociación entre el fenotipo acetilador lento y el cáncer de vejiga. Sin embargo, pocas enfermedades tienen

una demostración consistente de una relación entre el fenotipo y la predisposición. Por ejemplo, diversos estudios tienden a implicar al fenotipo rápido como un factor que incrementa la predisposición para cáncer de colon,<sup>86-88</sup> mientras que otros han sido incapaces de confirmar esta predisposición.<sup>89-91</sup> Las diferencias geográficas, etnia, poca investigación, diferencias en la dieta y diferencia en otros factores predisponentes entre los grupos de estudio, se han sugerido como las principales razones para los resultados tan variables reportados por laboratorios independientes. Publicaciones recientes sugieren que la actividad de NAT puede ser afectada por factores ambientales y por una baja regulación sustrato dependiente.<sup>92</sup> Esto también puede explicar porqué se han observado asociaciones controversiales.

Resultados más consistentes han sido reportados al relacionar el fenotipo acetilador con la exposición a agentes carcinógenos. Por ejemplo, el fenotipo acetilador rápido ha surgido como un fuerte factor que predispone a cáncer colorrectal en aquellos individuos que tienen una alta exposición a aminas heterocíclicas derivadas de la carne bien cocida (presumiblemente por agentes carcinogénicos, las aminas heterocíclicas).<sup>90,91,93</sup>

Se ha reportado también la asociación entre el genotipo NAT2 acetilador lento y carcinoma de células renales.<sup>94</sup>

Diversos estudios han investigado la asociación entre el fenotipo o genotipo acetilador NAT2 y el cáncer de mama, pero los hallazgos han sido inconsistentes.<sup>55</sup> Recientemente, la asociación entre el genotipo acetilador NAT2 y el cáncer de mama ha sido investigada en relación al humo del tabaco y la dieta. Deitz y cols.<sup>95</sup> sugirieron que los polimorfismos en NAT2 pueden ser un factor predisponente para cáncer de mama en mujeres expuestas a aminas heterocíclicas a través del consumo de carne bien cocida.

Algunos estudios han demostrado un aumento en la predisposición a cáncer de pulmón en fumadores con el genotipo homocigoto acetilador rápido (NAT2\*4/\*4).<sup>55,96</sup> En contraste, otros dos estudios no encontraron una asociación entre el genotipo acetilador NAT2 y el cáncer de pulmón. También se ha observado un aumento en la predisposición de mesotelioma maligno asociado a asbesto en acetiladores lentos, especialmente cuando se exponían a altos niveles de asbesto.<sup>55</sup>

El fenotipo acetilador NAT2 lento fue asociado con el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello en caucásicos y con el desarrollo de cáncer en el esófago y laringe en Japón. Los homocigotos para el genotipo acetilador NAT2 lento fue asociado con un incremento en la predisposición de cáncer de faringe y oral, pero no cáncer de laringe. El genotipo homocigoto acetilador rápido (NAT2\*4/\*4) fue asociado fuertemente con cáncer de laringe.<sup>55</sup>

El fenotipo acetilador se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Alzheimer ha sido relacionada con el fenotipo acetilador rápido y la enfermedad de Parkinson se relaciona con el fenotipo acetilador lento, aunque estos resultados necesitan ser confirmados con estudios epidemiológicos más extensos.<sup>29</sup>

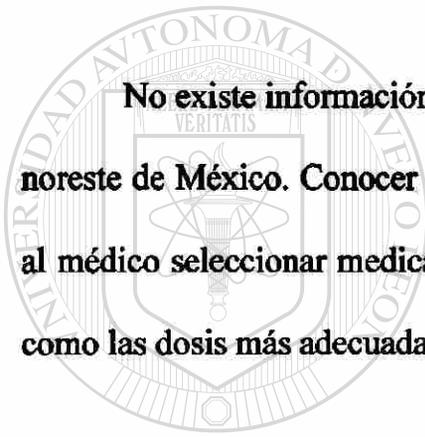
## CAPITULO II

### JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

#### 2.1 Justificación

Los polimorfismos en NAT2 que afectan la velocidad de acetilación son muy importantes en la farmacología clínica y la toxicología, porque tienen un papel primario en la activación y/o desactivación de un gran número de medicamentos aminoaromáticos e hidracinas, usados en la medicina clínica.

No existe información sobre el perfil individual de acetilación en la población del noreste de México. Conocer los polimorfismos predominantes en la población permitirá al médico seleccionar medicamentos más eficaces y menos tóxicos para el paciente, así como las dosis más adecuadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



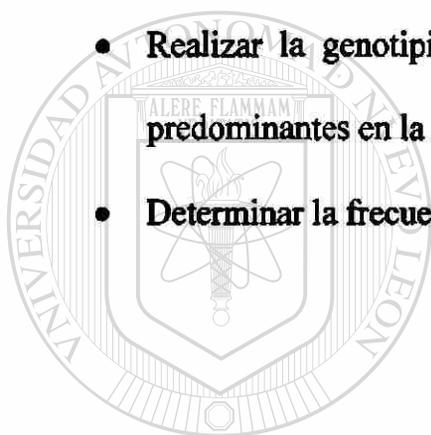
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.2 Objetivo general

Identificar los alelos de NAT2 presentes en una muestra de la población del noreste de México.

## 2.3 Objetivos específicos

- Amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones del gen NAT2 en las que se han reportado polimorfismos en otras poblaciones.
- Distinguir los polimorfismos por RFLPs.
- Realizar la genotipificación de los polimorfismos para determinar los alelos predominantes en la población estudiada.
- Determinar la frecuencia de las variantes alélicas encontradas.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Área de trabajo, reactivos y equipo

##### 3.1.1 Área Física

El trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

##### 3.1.2 Criterios de Inclusión de los Individuos en el Estudio

- Que dos generaciones anteriores fueran originarias del Noreste de México.
- Edad de 18 a 50 años.
- Personas sanas.
- Firmar la carta de consentimiento informado.

##### 3.1.3 Material Biológico

Se tomó una muestra de sangre periférica (5 ml) a 104 sujetos sanos, que fue recolectada en un tubo con EDTA como anticoagulante. Las muestras se recolectaron con la colaboración del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

##### 3.1.4 Reactivos químicos

Los reactivos necesarios para preparar las soluciones requeridas en la extracción de DNA genómico fueron: SDS, Trizma® Base y NaCl de SIGMA CHEMICAL CO

(St, Louis, MO, EUA), EDTA de Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA), el cloroformo y Etanol de la casa comercial Merck® (EM SCIENCE, Gibbstown, NJ, EUA), y el fenol se adquirió de SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA).

Las Reacciones de PCR se hicieron con la enzima *Taq* DNA polimerasa y con el  $MgCl_2$  de Promega Corporation (Madison, Wi, EUA). El buffer de PCR así como los dNTP's fueron adquiridos de GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA). Los iniciadores se adquirieron de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Los geles analíticos se prepararon con agarosa adquirida de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), y entre los reactivos para preparar el buffer de corrida TBE se encuentran Ácido Bórico y Trizma® Base de SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA) y EDTA de Amersham/Life Science (Cheveland, OH, EUA).

Las enzimas de restricción que se emplearon para digerir los productos amplificados fueron adquiridas de New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, EUA).

Para preparar los geles de poliacrilamida se utilizó Bisacrilamida, TEMED y PSA de la casa comercial SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA) y la Acrilamida se adquirió de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

### 3.1.5 Material consumible

El material de plástico que se utilizó fue: tubos Eppendorf ( 0.5, 1.5 y 2.0 ml) y puntillas (0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de BIOMOL SA de CV, Mex. También se utilizaron tubos falcon de 15 ml y guantes de látex de Cel Associates, Houston, TX, EUA.

### 3.1.6 Equipo

Se utilizó una Microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C, Incubadora SHEL-LAB, Microondas GoldStar modelo MA-857 M, Termomixer Eppendorf modelo 5436, balanza digital Sartorius modelo 1206 MP (Camibh Göttingen, Alemania), Balanza analítica OHAUS modelo APL1.

Las reacciones de PCR se montaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de la casa comercial Applied Biosystems. La electroforesis se realizó utilizando cámaras verticales y horizontales con fuentes de poder de BIO-RAD Life Science Research Products.

### 3.1.7 Programas de análisis computacional

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora personal Compaq Presario 1246 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO RAD).

El procesador de palabras utilizado fue Microsoft Word XP (Microsoft Corporation), hoja de cálculo Microsoft Excel XP (Microsoft Corporation), programa para presentaciones Microsoft PowerPoint XP (Microsoft Corporation), programa para gráficos Corel Photo-Paint (Corel Corporation), HP Scan-Jet 5100 C (Hewlett Packard, Inc.), el programa para diseño de iniciadores fue Oligo 4.0 (Nacional Biosciences, Inc.), el programa para analizar que los iniciadores amplifican la secuencia blanco, la especificidad que poseen y las condiciones de alineamiento, fue Amplify 2.53 (University of Wisconsin-Genetics), el programa para verificar las enzimas que cortan una secuencia blanco fue DNA Strider 1.3 (CEA, France).

Los programas usados por vía internet fueron: Entrez (Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) y Gen Bank (ICEGB, Trieste, Italia). El programa utilizado para la comunicación a través de Internet fue Microsoft Internet Explorer 5.5.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Estrategia General

Para desarrollar este trabajo y alcanzar los objetivos planteados, se siguió la estrategia que se esquematiza en la figura 4 y se detalla en los siguientes pasos:

1. Recolección de muestras de sangre periférica con EDTA como anticoagulante.
2. Obtención de DNA por medio de la técnica TSNT (Ausubel y cols., 1999).<sup>97</sup>
3. Amplificar cada muestra por PCR, usando cuatro juegos de iniciadores.

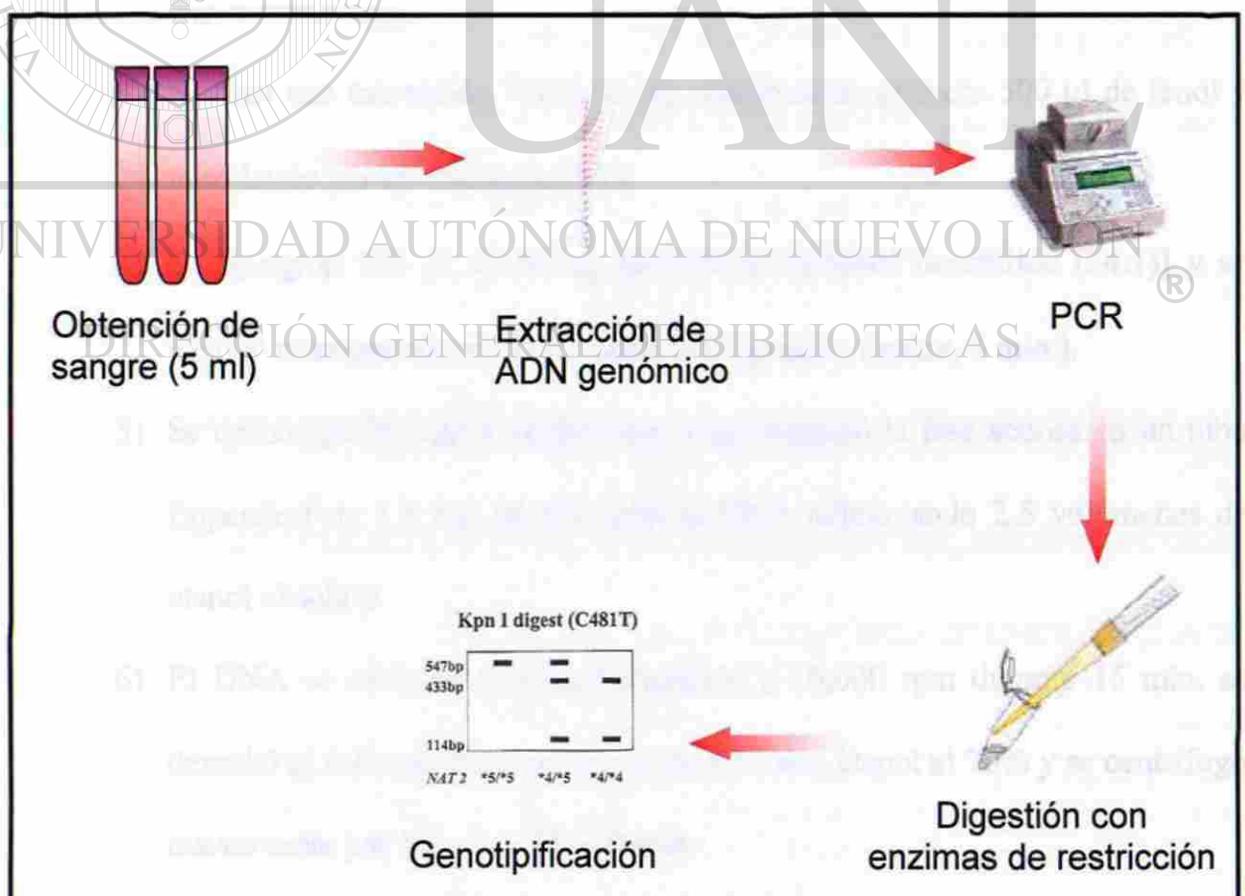


Figura 4. Esquema de la estrategia general.

4. Los productos amplificados se digirieron con enzimas de restricción y se verificaron en un gel de poliacrilamida para su genotipificación.

### 3.2.2 Extracción de DNA genómico por la técnica de TSNT

Se extrajo el DNA genómico de las muestras de sangre periférica de los sujetos sanos mediante el protocolo de Ausubel et al, 1999<sup>97</sup> que se describe a continuación.

#### 3.2.2.1 Protocolo

- 1) En un tubo Eppendorf de 2.0 ml se colocaron 500  $\mu$ l de sangre periférica con

EDTA.

- 2) Se adicionaron 200  $\mu$ l de buffer de lisis TSNT (2% Tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) y se mezcló por inversión para lograr lisis total.

- 3) Se hizo una extracción Fenol/Sevag, adicionando primero 500  $\mu$ l de fenol y mezclando por inversión por 30 s.

- 4) Se agregaron 100  $\mu$ l de Sevag [cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)] y se mezcló nuevamente en vórtex hasta homogenizar (aprox. 5 min.).

- 5) Se centrifugó 20 min a 10,000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se precipitó el DNA adicionando 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

- 6) El DNA se recuperó por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 10 min a 10,000 rpm.

- 7) Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ.

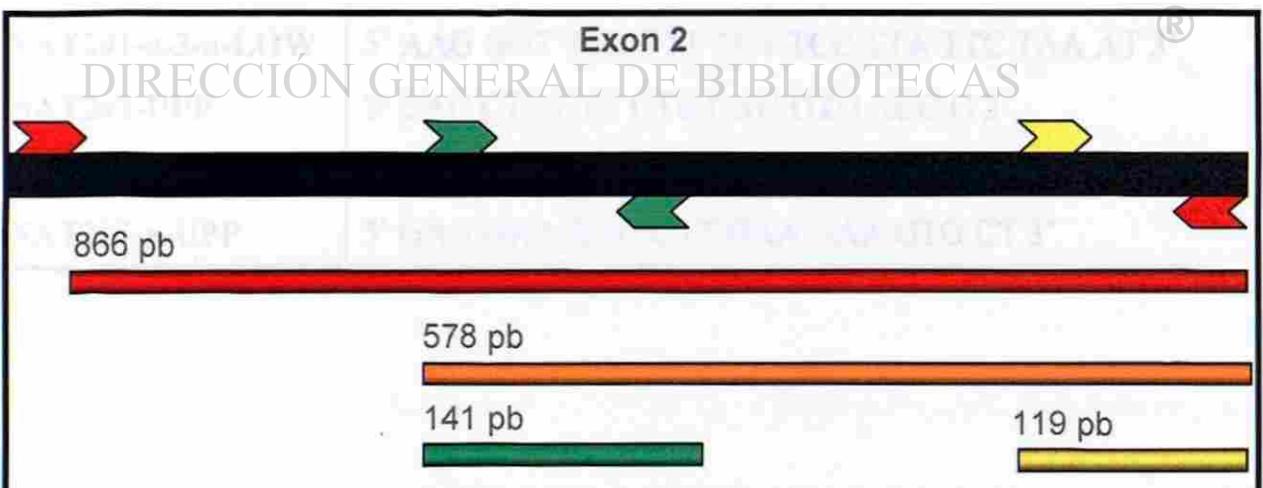
### 3.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

#### 3.2.3.1 Fundamento

Es una técnica rápida que utiliza *Taq* DNA polimerasa, un exceso de dNTPs y oligonucleótidos que hibridan con la secuencia blanco específica y mediante ciclos que incluyen las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión, se logran obtener millones de copias del fragmento de interés (Ausubel et al, 1999).<sup>97</sup> Las regiones amplificadas varían entre 130 - 1,000 pb de longitud.

#### 3.2.3.2 Diseño de los Iniciadores

Los iniciadores fueron diseñados utilizando los programas para diseño y amplificación *Oligo 4.0* y *Amplify 2.5*. Con estos oligonucleótidos se amplificaron cuatro fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb (Figura 5).



**Figura 5.** Amplificaciones en el exón 2 de NAT2. El fragmento de 866 pb abarca casi por completo toda la región codificante del gen. El fragmento de 578 pb es la amplificación de las últimas ¾ partes del exón 2. Los fragmentos de 141 pb y 119 pb se encuentran en la parte media y final del exón respectivamente.

Como se ve en la Figura 5 hay dos iniciadores que se utilizan para amplificar más de un fragmento los cuales son: NAT2#1-a-3-a-LOW que se utiliza para amplificar el fragmento de 866 pb, 578 pb y 119 pb, y NAT2#2-UPP el cual es usado para amplificar los fragmentos de 578 pb y 141 pb.

Como se muestra en la tabla IV el fragmento de 866 pb se amplifica con los iniciadores NAT2#1-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW. El fragmento de 578 pb se amplificó con los iniciadores NAT2#2-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW. Los iniciadores NAT2#2-UPP y NAT2#2-LOW se emplearon para amplificar el fragmento de 141 pb El iniciador NAT2#2-UPP que se utilizó para amplificar los fragmentos de 578 pb y 141 pb introducen un sitio de corte para la enzima *Msp* AI 1. La amplificación del fragmento de 119 pb se hizo con los iniciadores NAT2#3-a-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW.

**Tabla IV.** Iniciadores para amplificar los fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb.

Nombre	Secuencia
NAT2#1-UPP	5' GGC TAT AAG AAC TCT AGG AAC 3'
NAT2#1-a-3-a-LOW	5' AAG GGT TTA TTT TGT TCC TTA TTC TAA AT 3'
NAT2#2-UPP	5' CAC CTT CTC CTG CAG GTG ACC G 3'
NAT2#2-LOW	5' TGT CAA GCA GAA AAT GCA AGG C 3'
NAT2#3-a-UPP	5' GAG GAA GAG GTT GAA GAA GTG CT 3'

### 3.2.3.3 Condiciones de amplificación

Para amplificar los fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb se utilizaron las condiciones para la PCR que se muestran en la tabla V.

**Tabla V.** Condiciones de amplificación para los fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb.

Reactivo	Concentración final	Volumen usado para la amplificación de los fragmentos			
		866 pb	578 pb	141 pb	119 pb
Buffer Taq pol	1x	6µl	5µl	5µl	5µl
MgCl <sub>2</sub>	1.5µM	3.6µl	3µl	3µl	3µl
dNTPs	0.25 o 0.3 µM	1.5µl	1.5µl	1.5µl	1.5µl
Iniciador NAT2#1-UPP	0.25 o 0.3 µM	3µl	---	---	---
Iniciador NAT2#1-a-3-a-LOW	0.25µM	3µl	3µl	---	3µl
Iniciador NAT2#2-UPP	0.3µM	---	3µl	3µl	---
Iniciador NAT2#2-LOW	0.3µM	---	---	3µl	---
Iniciador NAT2#3-a-UPP	0.3µM	---	---	---	3µl
Agua MiliQ	---	40.5µl	32.1µl	32.1µl	33.1µl
Taq Pol	2U	0.4µl	0.4µl	0.4µl	0.4µl
DNA	200 o 100 ng/µl	2µl	2µl	2µl	1µl
	Total	60µl	50µl	50µl	50µl

En la tabla VI se muestran el programa de amplificación para el fragmento de 866 pb.

**Tabla VI.** Programa para la amplificación del fragmento de 866 pb.

	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	94 °C	5 min.
10 ciclos		
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	1 min.
<b>Alineación</b>	53 °C	1 min.
<b>Extensión</b>	72 °C	1 min.
25 ciclos		
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	1 min.
<b>Alineación</b>	55 °C	1 min.
<b>Extensión</b>	72 °C	1 min.
<b>Extensión final</b>	72 °C	5 min.

Para amplificar el fragmento de 578 pb se utilizó el programa de la tabla VII.

**Tabla VII.** Programa para la amplificación del fragmento de 578 pb.

	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	94 °C	5 min.
30 ciclos		
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	30 seg.
<b>Alineación</b>	58 °C	30 seg.
<b>Extensión</b>	72 °C	45 seg.
<b>Extensión final</b>	72 °C	5 min.

El programa que se utilizó en la PCR para amplificar los fragmentos de 141 pb y 119 pb se muestra en la tabla VIII.

**Tabla VIII.** Programa para la amplificación de los fragmentos de 141 pb y 119 pb.

	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	94 °C	5 min.
30 ciclos		
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	30 seg.
<b>Alineación</b>	58 °C	30 seg.
<b>Extensión</b>	72 °C	30 seg.
<b>Extensión final</b>	72 °C	5 min.

Los productos de 866 pb se verificaron en un gel de agarosa al 1% y los productos amplificados de 141 pb y 119 pb se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

Después de haber obtenido los productos amplificados se sometieron a corte con enzimas de restricción para detectar los polimorfismos.

### **3.2.4 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)**

#### **3.2.4.1 Fundamento**

Esta técnica se basa en la utilización de enzimas de restricción que reconocen sitios de corte específicos en el DNA. Es decir, si en un producto amplificado un polimorfismo agrega o elimina un sitio de corte para una determinada enzima, se generan fragmentos de peso molecular distintos, que en un producto amplificado sin el

polimorfismo. Estos fragmentos son visibles en un gel, donde se determina la presencia o ausencia del polimorfismo.

### 3.2.4.2 Digestión

Partiendo del análisis de restricción elaborado en el programa DNA Strider 1.3, se identificaron las enzimas apropiadas para digerir los productos amplificados de 866 pb, 141 pb y 199 pb.

Del producto de 866 pb se detectaron los polimorfismos T111C, G191A, C282T, A434C, C481T, G590A, C759T, A845C y G857A. Del producto de 141 pb se detectó el polimorfismo T341C y del producto de 119 pb se detectó el polimorfismo A803G.

El producto amplificado de 866 pb fue digerido con las enzimas que se muestran en la tabla IX para los polimorfismos antes mencionados.

**Tabla IX.** Enzimas de restricción que digieren el producto amplificado de 866 pb, donde se muestran los fragmentos esperados de los alelos normales y mutados para cada polimorfismo.

Polimorfismo	Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)	
		Alelo Normal (N)	Alelo con Polimorfismo (P)
T111C	<i>Taq</i> I	331, 226, 170, 139	252, 226, 170, 139 y 79
G191A	<i>Msp</i> I	708, 93, 65	801 y 65
C282T	<i>Fok</i> I	429, 238, 199	667 y 199
A434C	<i>Msp</i> I	708, 93, 65	464, 244, 93 y 65
C481T	<i>Kpn</i> I	445, 421	866
G590A	<i>Taq</i> I	331, 226, 170, 139	396, 331 y 139
C759T	<i>Taq</i> I	331, 226, 170, 139	331, 309 y 226
A845C	<i>Dra</i> III	429, 238, 199	429, 238, 153 y 46
G857A	<i>Hinf</i> I	429, 290, 137	439, 249, 137 y 41

El producto amplificado de 141 pb fue digerido con la enzima que se muestra en la tabla X para el polimorfismo T341C.

**Tabla X.** Enzima de restricción que digiere el producto amplificado de 141 pb, donde se muestran los fragmentos esperados del alelo normal y mutado para el polimorfismo T341C.

Polimorfismo	Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)	
		Alelo Normal (N)	Alelo con Polimorfismo (P)
T341C	<i>Msp</i> A1 I	141	122, 19

El producto amplificado de 119 pb fue digerido con la enzima que se muestra en la tabla XI para el polimorfismo A803G.

**Tabla XI.** Enzima de restricción que digiere el producto amplificado de 119pb, donde se muestran los fragmentos esperados del alelo normal y mutado para el polimorfismo A803G.

Polimorfismo	Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)	
		Alelo Normal (N)	Alelo con Polimorfismo (P)
A803G	<i>Dde</i> I	119	97, 23

Las condiciones para las reacciones de digestión fueron de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial New England Biolabs (Tabla XII).

Tabla XII. Reacción de digestión de las diferentes enzimas de restricción.

Reactivo	Concentración final	Volumen usado para la digestión con						
		<i>Taq I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Fok I</i> y <i>Dra III</i>	<i>Kpn I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Msp A1 I</i>	<i>Dde I</i>
Buffer <i>Taq I</i>	1x	2µl	---	---	---	---	---	---
Buffer 1	1x	---	---	---	1µl	---	---	---
Buffer 2	1x	---	2µl	---	---	2µl	---	---
Buffer 3	1x	---	---	2µl	---	---	---	1µl
Buffer 4	1x	---	---	---	---	---	2µl	---
BSA	1x	2µl	---	2µl	1µl	---	2µl	---
Agua MiliQ	---	4µl	5.5µl	3µl	2.25µl	6.25µl	4.5µl	1µl
PA	---	11µl	11µl	11µl	5.5µl	11µl	11µl	7.5µl
<i>Taq I</i> **	10U	1µl	---	---	---	---	---	---
<i>Msp I</i> *	15U	---	1.5µl	---	---	---	---	---
<i>Fok I</i> *	4U	---	---	1µl	---	---	---	---
<i>Dra III</i> *	20U	---	---	1µl	---	---	---	---
<i>Kpn I</i> *	5U	---	---	---	0.25µl	---	---	---
<i>Hinf I</i> *	7.5U	---	---	---	---	0.75µl	---	---
<i>Msp A1 I</i> *	5U	---	---	---	---	---	0.5µl	---
<i>Dde I</i> *	2.5U	---	---	---	---	---	---	0.5µl
	Total	20µl	20µl	20µl	10µl	20µl	20µl	10µl

PA= Producto amplificado.

\* La reacción se incubó a 37°C por 16 h.

\*\* La reacción se incubó a 65°C por 16 h.

Después del tiempo de incubación, los productos de las digestiones con las enzimas *Taq I* (T111C, G590A y C759T), *Msp I* (G191A y A434C), *Fok I* y *Dra III* (C282T y A845C), *Kpn I* (C481T) y *Hinf I* (G857A) se sometieron a electroforesis (200

V por 4 h) en geles de poliacrilamida al 12%, para la enzima *Msp* A1 I (T341C) la electroforesis se hizo en geles de poliacrilamida al 15% (200 V por 4 h), y para la enzima *Dde* I (A803G) también se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% (120 V por 1.5 h). Después se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron los fragmentos para determinar que polimorfismos estaban presentes.

### 3.3 Genotipificación

De acuerdo a la nomenclatura establecida se hizo la clasificación de alelos en base a los polimorfismos presentes en cada muestra. A los individuos que eran homocigotos, poseían un solo polimorfismo o cuando un polimorfismo se encontraba en ambos alelos y además solamente uno de los alelos tenía otro polimorfismo inmediatamente se les asignaba el nombre del alelo y su velocidad de acetilación. A los demás se procedió a determinar que alelos les correspondían.

#### 3.3.1. Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*4

Como ya se mencionó el alelo NAT2\*5B está compuesto por tres polimorfismos que son T341C, C481T y A803G y el alelo NAT2\*4 no contiene ningún polimorfismo. Para comprobar que estos tres polimorfismos estaban en el mismo alelo se realizaron varios pasos.

##### 3.3.1.1. Amplificación del fragmento de 578 pb.

Los iniciadores utilizados fueron NAT2#2-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW (Tabla IV) y las condiciones de la PCR se muestran en la tabla VII. Se usó el iniciador NAT2#2-UPP por que introduce un sitio de corte para la enzima *Msp* AI 1 que identifica el polimorfismo T341C.

### 3.3.1.2. Digestión

Se realizó una doble digestión con las enzimas *Kpn* I y *Msp* A1 I para identificar los polimorfismos T341C y C481T. No se usó *Dde* I (A803G) debido a que esta enzima tiene otros sitios de corte en este producto amplificado haciendo que los polimorfismos queden en diferentes fragmentos y por lo tanto no se puede saber si esos fragmentos con los otros polimorfismos pertenecen al mismo alelo. La reacción de digestión se presenta en la tabla XIII y los fragmentos esperados para cada alelo están en la tabla XIV.

**Tabla XIII.** Reacción de digestión de las enzimas *Kpn* I y *Msp* A1 I .

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer 2	1x	3 $\mu$ l
BSA	1x	3 $\mu$ l
Agua MiliQ	---	2.5 $\mu$ l
PA	---	20 $\mu$ l
<i>Kpn</i> I	5U	0.5 $\mu$ l
<i>Msp</i> A1 I	10U	1 $\mu$ l
	Total	30 $\mu$ l

PA= Producto amplificado. La reacción se incubó a 37°C por 16 h.

**Tabla XIV.** Fragmentos esperados de los alelos NAT2\*5B y NAT2\*4.

Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)	
	NAT2*5B	NAT2*4
<i>Kpn</i> I y <i>Msp</i> A1 I	559, 19	421, 157

El producto digerido se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%.

### **3.3.1.3. Recuperación y purificación de la banda de interés.**

La banda de interés se recuperó del gel y se purificó mediante la técnica con fibra de vidrio.

#### **3.3.1.3.1 Protocolo**

1. Se puso fibra de vidrio en tubos de 0.5 mL, los cuales tienen una abertura en la parte inferior.
2. Se cortó del gel la banda de interés y se colocó en el tubo de 0.5 mL con fibra de vidrio.
3. Se colocó el tubo de 0.5 mL con la banda de interés en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min.
4. Al líquido recuperado en el tubo de 1.5 mL se le hizo una extracción fenol:sevag ( $\frac{1}{2}$  V/  $\frac{1}{2}$  V), agitándolo en el vortex (aprox. 5 min.).
5. Se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min.
6. La fase acuosa se recuperó y el DNA se precipitó adicionando 2.5 volúmenes de etanol absoluto
7. El DNA se recuperó por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 10 min a 10,000 rpm.
8. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 6  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ.

#### **3.3.1.4. Reamplificación del fragmento de 119 pb.**

De la banda purificada se reamplificó el fragmento de 119 pb usando los mismos iniciadores (NAT2#3-a-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW) y condiciones de amplificación ya antes mencionados en la tablas IV y VIII respectivamente.

#### **3.3.1.5. Digestión con la enzima *Dde* I.**

La digestión con esta enzima se realizó como se explicó anteriormente usando la misma reacción de digestión (Tabla XII) y esperando los mismos fragmentos (Tabla XI) para el alelo normal y el alelo con el polimorfismo. La digestión se visualizó en un gel de poliacrilamida al 15% (120 V por 1.5 h).

#### **3.3.2. Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*6A**

Para determinar el alelo NAT2\*5B se utilizaron los pasos mencionados en el tema 3.3.1 (Identificación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*4). El alelo NAT2\*6A se compone de los polimorfismos C282T y G590A. Se realizaron varios pasos para comprobar que estos dos polimorfismos pertenecían a otro alelo.

##### **3.3.2.1. Amplificación del fragmento de 866 pb.**

Se utilizaron las mismas condiciones de la PCR que se muestran en la tabla VI e iniciadores (NAT2#1-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW) de la tabla IV que ya se habían descrito anteriormente.

##### **3.3.2.2. Digestión**

Se realizaron dos dobles digestiones una con las enzimas *Kpn* I y *Fok* I y otra con *Kpn* I y *Taq* I para identificar los polimorfismos C481T, C282T y G590A. Se utilizó *Kpn* I (C481T) debido a que esta enzima no corta el producto amplificado cuando está

presente el polimorfismo como es el caso del alelo NAT2\*5B, y también por que nos permite saber que los otros dos polimorfismos no están en el alelo donde está el polimorfismo, y por lo tanto están juntos en el otro alelo.

La reacción de digestión para *Kpn* I y *Fok* I se presenta en la tabla XV y los fragmentos esperados para cada polimorfismo están en la tabla XVI.

**Tabla XV.** Reacción de digestión de las enzimas *Kpn* I y *Fok* I.

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer 4	1x	2 $\mu$ l
BSA	1x	2 $\mu$ l
Agua MiliQ	---	---
PA	---	14.5 $\mu$ l
<i>Kpn</i> I	5U	0.5 $\mu$ l
<i>Fok</i> I	4U	1 $\mu$ l
	<b>Total</b>	<b>20<math>\mu</math>l</b>

PA= Producto amplificado. La reacción se incubó a 37°C por 16 h.

**Tabla XVI.** Fragmentos esperados de los polimorfismos C481T y C282T.

Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)			
	C481T		C282T	
	Normal (N)	Polimorfismo (P)	Normal (N)	Polimorfismo (P)
<i>Kpn</i> I y <i>Fok</i> I	238, 222, 207, 199	429, 238, 199	238, 222, 207, 199	445, 222, 199

Los fragmentos esperados para los polimorfismos C481T y G590A están en la tabla XVIII y en la reacción de digestión para las enzimas *Kpn* I y *Taq* I (Tabla XVII) primero se agregó la enzima *Taq* I y se incubó a 65°C por 16 h y en el mismo tubo se agregó la enzima *Kpn* I y se incubó a 37°C por 16 h.

**Tabla XVII.** Reacción de digestión de las enzimas *Kpn* I y *Taq* I.

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer <i>Taq</i> I	1x	2µl
BSA	1x	2µl
Agua MiliQ	---	---
PA	---	14.5µl
<i>Kpn</i> I*	5U	0.5µl
<i>Taq</i> I**	10U	1µl
	Total	20µl

PA= Producto amplificado. \*La reacción se incubó a 37°C por 16 h. \*\*La reacción se incubó a 65°C por 16 h.

**Tabla XVIII.** Fragmentos esperados de los polimorfismos C481T y G590A.

Enzimas de Restricción	Fragmentos esperados (pb)			
	C481T		G590A	
	Normal (N)	Polimorfismo (P)	Normal (N)	Polimorfismo (P)
<i>Kpn</i> I y <i>Taq</i> I	331, 170, 139, 114, 112	331, 226, 170, 139	331, 170, 139, 114, 112	331, 282, 139, 114

Después del tiempo de incubación, los productos de las digestiones se sometieron a electroforesis (200 V por 4 h) en geles de poliacrilamida al 12%.

### **3.3.3. Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*6B**

La determinación del alelo NAT2\*5B se realizó con los pasos mencionados en el tema 3.3.1 (Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*4). El alelo NAT2\*6B está compuesto por el polimorfismo G590A. Se realizaron los pasos del tema 3.3.2.2 (Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*6A) para comprobar que el polimorfismo G590A se encontraba en el otro alelo.

### **3.3.4. Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*6C**

Solamente se determinaron la presencia de los polimorfismos T341C y C481T del alelo NAT2\*5B realizando los pasos mencionados en el tema 3.3.1. El alelo NAT2\*6C que contiene los polimorfismos C282T, G590A, A803G, de los cuales solo fue necesario comprobar que los polimorfismos C282T y G590A estuvieran en el mismo alelo, siguiendo los pasos del tema 3.3.2. El polimorfismo A803G al estar presente en ambos alelos no fue necesario determinarlo.

### **3.3.5. Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*7B**

Para determinar el alelo NAT2\*5B se utilizaron los pasos mencionados en el tema 3.3.1. El alelo NAT2\*7B está compuesto de los polimorfismos C282T y G857A. Se realizaron varios pasos para comprobar que estos dos polimorfismos se encontraban en el otro alelo.

#### **3.3.5.1. Amplificación del fragmento de 866 pb.**

Se utilizaron las mismas condiciones de la PCR que se muestran en la tabla VI e iniciadores (NAT2#1-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW) de la tabla IV que ya se habían descrito anteriormente.

### 3.3.5.2. Digestión

Se realizaron dos dobles digestiones, una con las enzimas *Kpn* I y *Fok* I y otra con *Dde* I y *Hinf* I para identificar los polimorfismos C481T, C282T y G857A. El procedimiento para comprobar que el polimorfismo C282T se encuentra en un alelo diferente se describe en el tema 3.3.2.2. En el polimorfismo G857A que lo corta la enzima *Hinf* I se utilizó *Dde* I (A803G), porque *Hinf* I divide en tres fragmentos el producto amplificado dejando en diferentes fragmentos los polimorfismo C481T y G857A pero no al polimorfismo A803G que queda en el mismo fragmento del polimorfismo G857A.

La reacción de digestión para *Dde* I y *Hinf* I se presenta en la tabla XIX y los fragmentos esperados para cada polimorfismo están en la tabla XX.

**Tabla XIX.** Reacción de digestión de las enzimas *Dde* I y *Hinf* I.

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer 2	1x	2 $\mu$ l
Agua MiliQ	---	---
PA	---	15.5 $\mu$ l
<i>Dde</i> I	7.5U	1.5 $\mu$ l
<i>Hinf</i> I	10U	1 $\mu$ l
	Total	20 $\mu$ l

PA= Producto amplificado. La reacción se incubó a 37°C por 16 h.

**Tabla XX.** Fragmentos esperados de los polimorfismos A803G y G857A.

Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)			
	A803G		G857A	
	Normal (N)	Polimorfismo (P)	Normal (N)	Polimorfismo (P)
<i>Dde I y Hinf I</i>	278, 169, 137, 122, 121, 39	278, 169, 137, 122, 98, 39, 23	278, 169, 137, 122, 121, 39	278, 169, 137, 122, 80, 41, 39

Pasado del tiempo de incubación, los productos de las digestiones se sometieron a electroforesis (200 V por 4 h) en geles de poliacrilamida al 12%.

### 3.3.6. Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*12A

Para la diferenciación de estos alelo, solo fue necesario determinar que los polimorfismos T341C y C481T se encontraban en el alelo NAT2\*5B, siguiendo los pasos mencionados en el tema 3.3.1. Al contener ambos alelos el polimorfismo A803G no fue necesario determinarlo.

### 3.3.7. Diferenciación del alelo NAT2\*5B de NAT2\*12B

Del alelo NAT2\*5B se determinaron la presencia del los polimorfismos T341C y C481T siguiendo los pasos mencionados en el tema 3.3.1. El alelo NAT2\*12B está compuesto por los polimorfismos C282T y A803G, de los cuales solo fue necesario comprobar que el polimorfismo C282T estuvieran en diferente alelo, siguiendo los pasos del tema 3.3.2. Al tener ambos alelos el polimorfismo A803G no fue necesario determinarlo.

### 3.3.8. Diferenciación del alelo NAT2\*5A de NAT2\*4

El alelo NAT2\*5A está compuesto de los polimorfismos T341C y C481T y el alelo NAT2\*4 no contiene ningún polimorfismo. Se utilizaron los pasos mencionados en el tema 3.3.1.

### 3.3.9. Diferenciación del alelo NAT2\*5C de NAT2\*4

El alelo NAT2\*5C lo componen los polimorfismos T341C y A803G y el alelo NAT2\*4 no contiene ningún polimorfismo. Para comprobar que estos dos polimorfismos se encontraban en el mismo alelo se realizaron varios pasos.

#### 3.3.9.1. Amplificación del fragmento de 578 pb.

Los iniciadores utilizados fueron NAT2#2-UPP y NAT2#1-a-3-a-LOW (Tabla IV) y las condiciones de la PCR se muestran en la tabla VII. Se usó el iniciador NAT2#2-UPP por que introduce un sitio de corte para la enzima *Msp* AI 1 que identifica el polimorfismo T341C.

#### 3.3.9.2. Digestión

Se realizó una digestión con la enzima *Msp* AI I para identificar el polimorfismo T341C. No se usó *Dde* I (A803G) debido a que esta enzima tiene otros sitios de corte en este producto amplificado, haciendo que los polimorfismos queden en diferentes fragmentos y por lo tanto no se puede saber si esos fragmentos con el otro polimorfismo pertenecen al mismo alelo. La reacción de digestión se presenta en la tabla XII y los fragmentos esperados para cada alelo están en la tabla XXI.

**Tabla XXI.** Fragmentos esperados de los alelos NAT2\*5C y NAT2\*4.

Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)	
	NAT2*5C	NAT2*4
<i>Msp</i> A1 I	559, 19	421, 157

El producto digerido se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%.

Después se procedió a recuperar la banda de interés, reamplificarla y digerirla con la enzima *Dde* I, siguiendo los pasos mencionados en los temas 3.3.1.3, 3.3.1.4 y 3.3.1.5.

### 3.3.10. Diferenciación del alelo NAT2\*5C de NAT2\*7B

Para determinar el alelo NAT2\*5C se utilizaron los pasos mencionados en el tema 3.3.9. (Diferenciación del alelo NAT2\*5C de NAT2\*4). El alelo NAT2\*7B está compuesto de los polimorfismos C282T y G857A. Solamente se pudo detectar si el polimorfismo G857A se encontraba en otro alelo siguiendo los pasos de la digestión de las enzimas *Dde* I y *Hinf* I en el tema 3.3.5.2.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

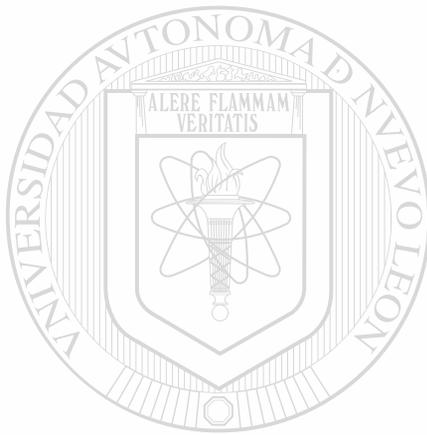
### 3.3.4. Diferenciación del alelo NAT2\*13B de NAT2\*4

Los polimorfismos C282T y C481T componen al alelo NAT2\*13B, mientras que el alelo NAT2\*4 no contiene ningún polimorfismo. Se utilizaron las condiciones de digestión de las enzimas *Kpn* I y *Fok* I del tema 3.3.5.2, pero como estos dos polimorfismos están en el mismo alelo se esperaron los fragmentos de la tabla XXII

**Tabla XXII. Fragmentos esperados de los alelos NAT2\*13B y NAT2\*4.**

Enzimas de restricción	Fragmentos esperados (pb)	
	NAT2*13B	NAT2*4
<i>Kpn I</i> y <i>Fok I</i>	667, 199	238, 222, 207, 199

Después de determinar que alelos le pertenecían a los individuos heterocigotos se les asignó el nombre de los alelos y su velocidad de acetilación.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica recolectada.

En la figura 6 se presenta el DNA extraído a partir de algunas de las 104 muestras recolectadas de sangre periférica con EDTA, el cual se muestra de alto peso molecular.

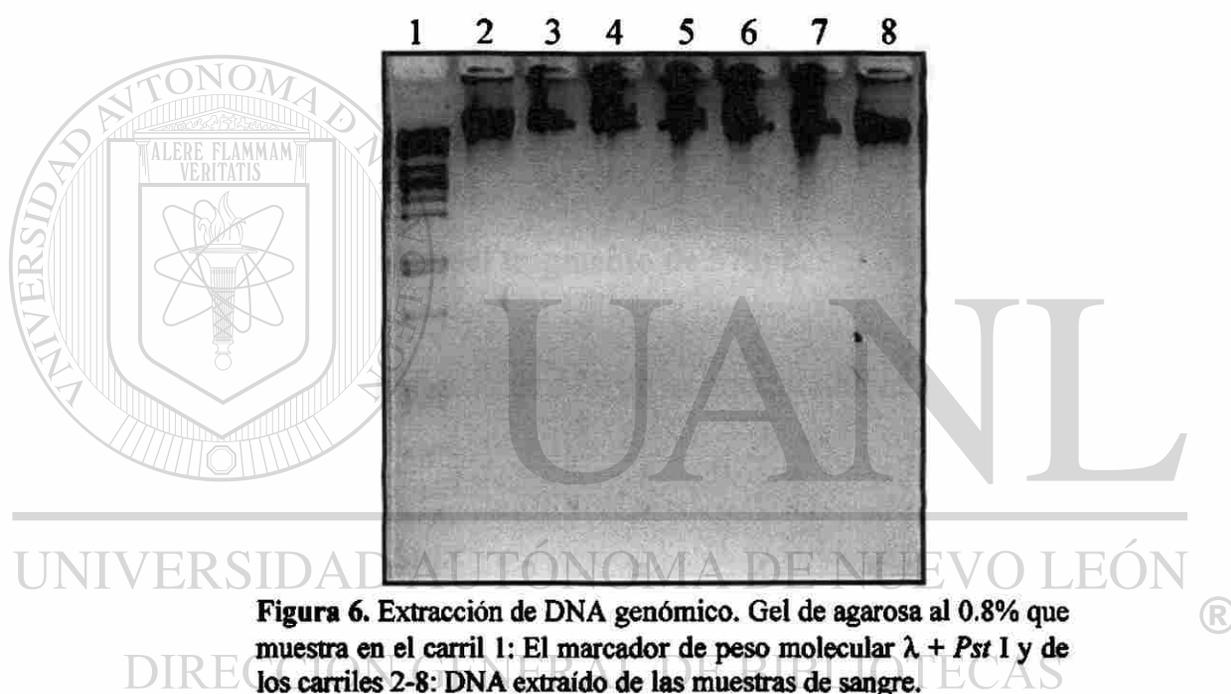
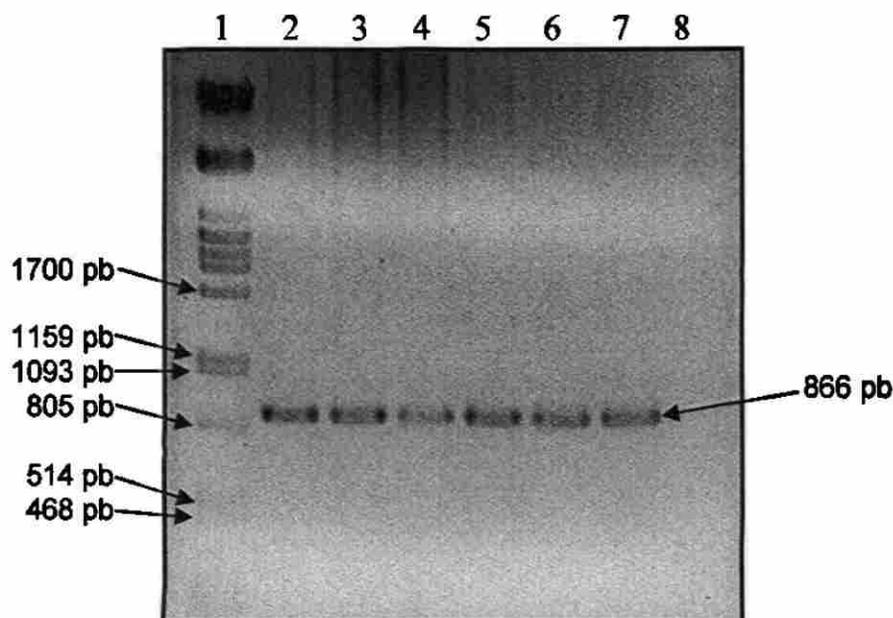


Figura 6. Extracción de DNA genómico. Gel de agarosa al 0.8% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular  $\lambda + Pst$  I y de los carriles 2-8: DNA extraído de las muestras de sangre.

#### 4.2 Amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para las regiones donde se han reportado polimorfismos en otras poblaciones.

##### 4.2.1 Amplificación del fragmento de 866 pb.

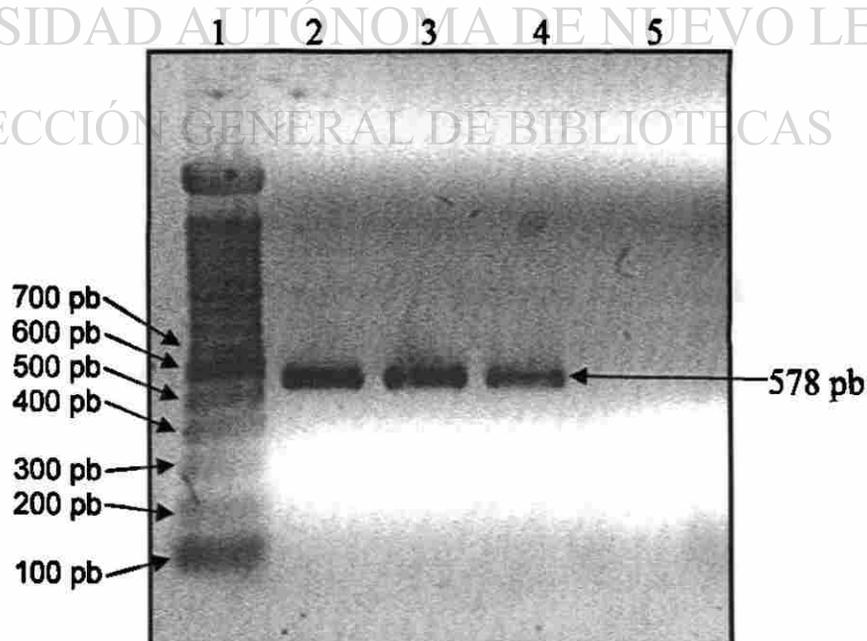
En la figura 7 se muestra el producto amplificado de 866 pb con las condiciones descritas en las tablas V y VI. En este fragmento se analizó la presencia de 9 de los polimorfismos descritos.



**Figura 7.** Producto amplificado de 866 pb. Gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular  $\lambda + Pst$  I; de los carriles 2-7: Producto amplificado de 866pb y en el carril 8: Control negativo.

#### 4.2.2 Amplificación del fragmento de 578pb.

El producto amplificado de 578 pb se muestra en la figura 8, el cual se utilizó para la genotipificación.



**Figura 8.** Producto amplificado de 578 pb. Gel de agarosa al 1.5 % que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-4: Producto amplificado de 578pb y en el carril 5: Control negativo.

### 4.2.3 Amplificación del fragmento de 141pb.

El producto amplificado de 141 pb se muestra en el gel de la figura 9, mismo en el que se analizó la presencia del polimorfismo T341C.

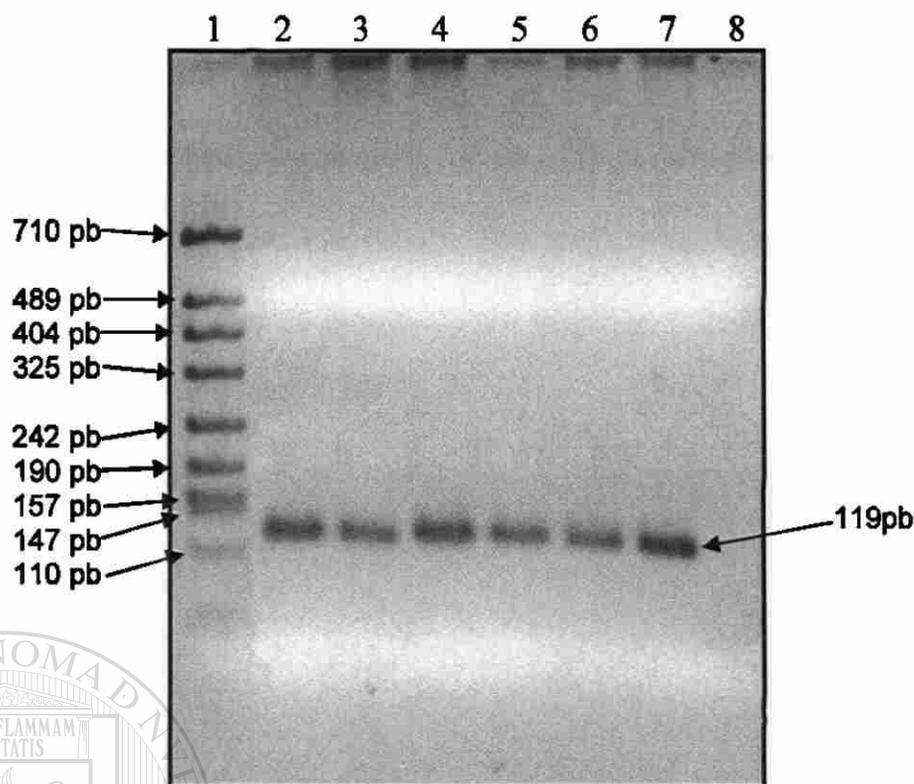


Figura 9. Producto amplificado de 141 pb. Gel de agarosa al 2% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular pBS + *Msp* I; de los carriles 2-7: Producto amplificado de 141 pb y en el carril 8: Control negativo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 4.2.4 Amplificación del fragmento de 119pb.

El gel de la figura 10 muestra el producto amplificado de 119 pb donde se analizó la presencia del polimorfismo A803G.



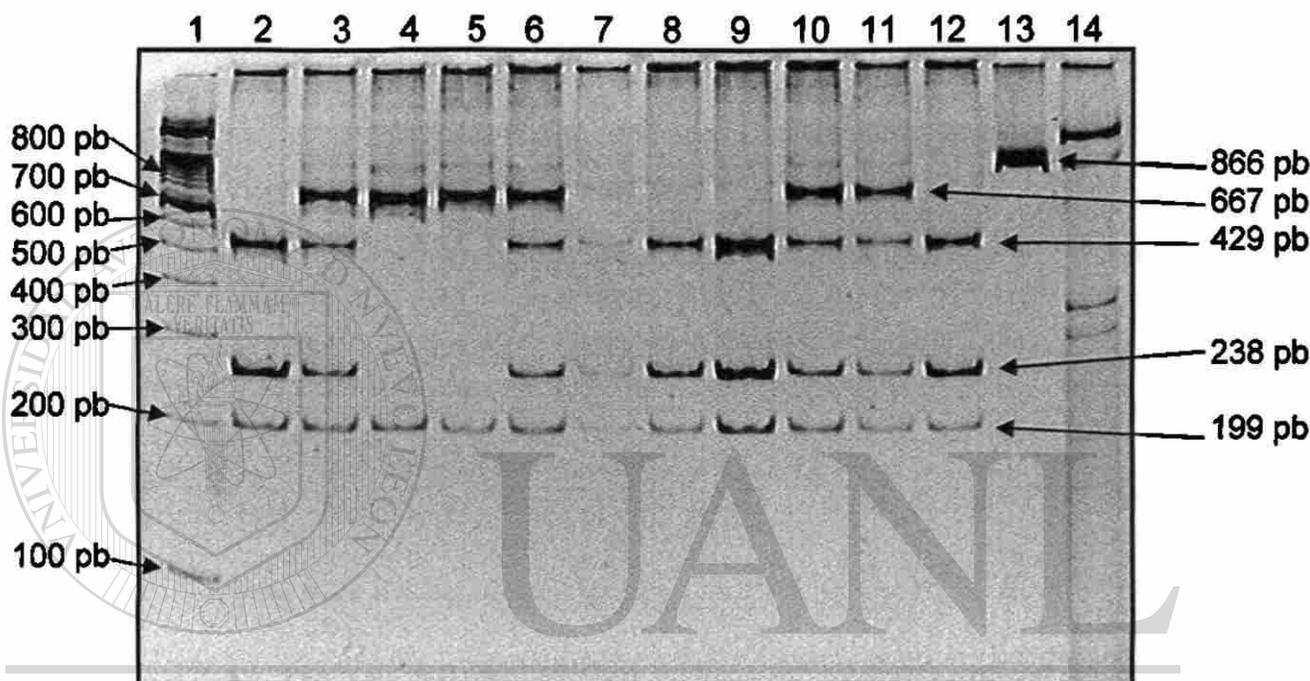
**Figura 10.** Producto amplificado de 119 pb. Gel de agarosa al 2% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular pBS + *Msp* I; de los carriles 2-7: Producto amplificado de 119 pb y en el carril 8: Control negativo.

#### 4.3 Identificación de polimorfismos por RFLPs.

##### 4.3.1 Identificación de los polimorfismos en el producto amplificado de 866 pb

En el gel de la figura 11 se muestra una doble digestión del producto amplificado de 866pb con la enzima *Fok* I para detectar el polimorfismo C282T y la enzima *Dra* III para identificar el polimorfismo A845C. Los fragmentos que se esperaban para un sujeto homocigoto normal son los de 429 pb, 238 pb, 199 pb. En un sujeto heterocigoto para el polimorfismo C282T se esperaban los fragmentos antes mencionados y además un fragmento adicional de 667 pb. En el sujeto homocigoto para el polimorfismo C282T se esperaban el fragmento de 199 pb y el de 667 pb, el cual se forma por la pérdida del sitio

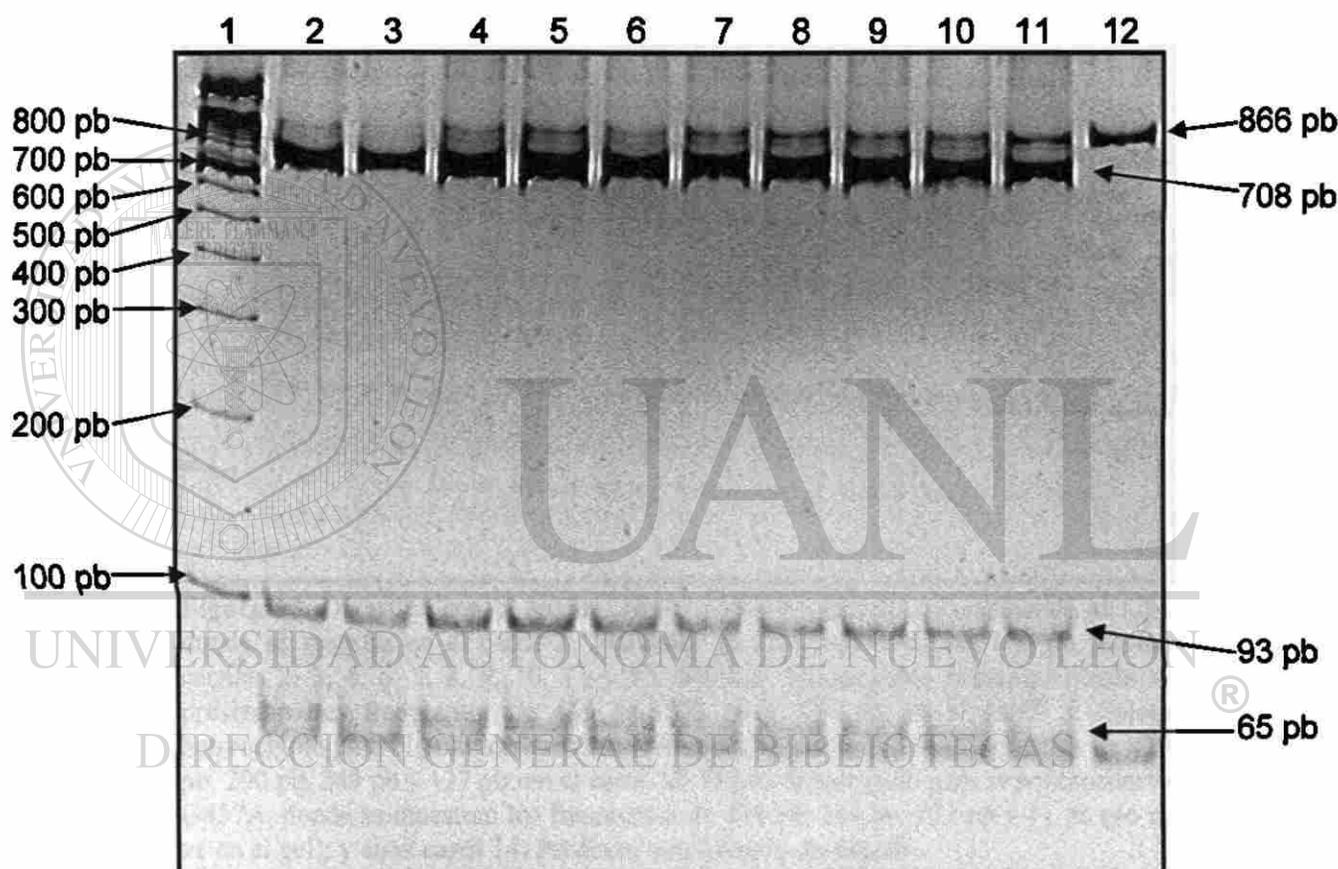
de corte para la enzima *Fok I* al no generarse los fragmentos de 429 pb y 238 pb. En un sujeto heterocigoto para el polimorfismo A845C se esperaban los fragmentos mencionados para el homocigoto normal (429 pb, 238 pb, 199 pb) y dos fragmentos más de 814 pb y 52 pb. En el sujeto homocigoto para este polimorfismo (A845C) se crea un sitio de corte para enzima *Dra III* generando dos fragmentos de 814 pb y 52 pb.



**Figura 11.** Digestión con las enzimas *Fok I* (C282T) y *Dra III* (A845C). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2, 7, 8, 9 y 12: Sujetos homocigotos normales donde se presentan tres fragmentos de 429 pb, 238 pb y 199 pb; en los carriles 3, 6, 10 y 11: Sujetos heterocigotos para la mutación C282T donde se muestran los fragmentos de 667 pb, 429 pb, 238 pb y 199 pb; en los carriles 4 y 5, Sujetos homocigotos para el polimorfismo C282T, donde se muestran los fragmentos de 667 pb y 199 pb; en el carril 13: Producto amplificado sin digerir; y en el carril 14: pBS digerido con *Fok I* y *Dra III* como testigo de corte. El polimorfismo A845C no se detectó, al no encontrarse las bandas esperadas de 814 pb y 52 pb.

En la figura 12 podemos ver el gel con la digestión del producto amplificado de 866 pb digerido con la enzima *Msp I* para los polimorfismos G191A y A434C, en el cual solo se observan homocigotos normales para ambos polimorfismos. Los fragmentos de 708 pb, 93 pb y 65 pb son los esperados para los homocigotos normales para estos dos

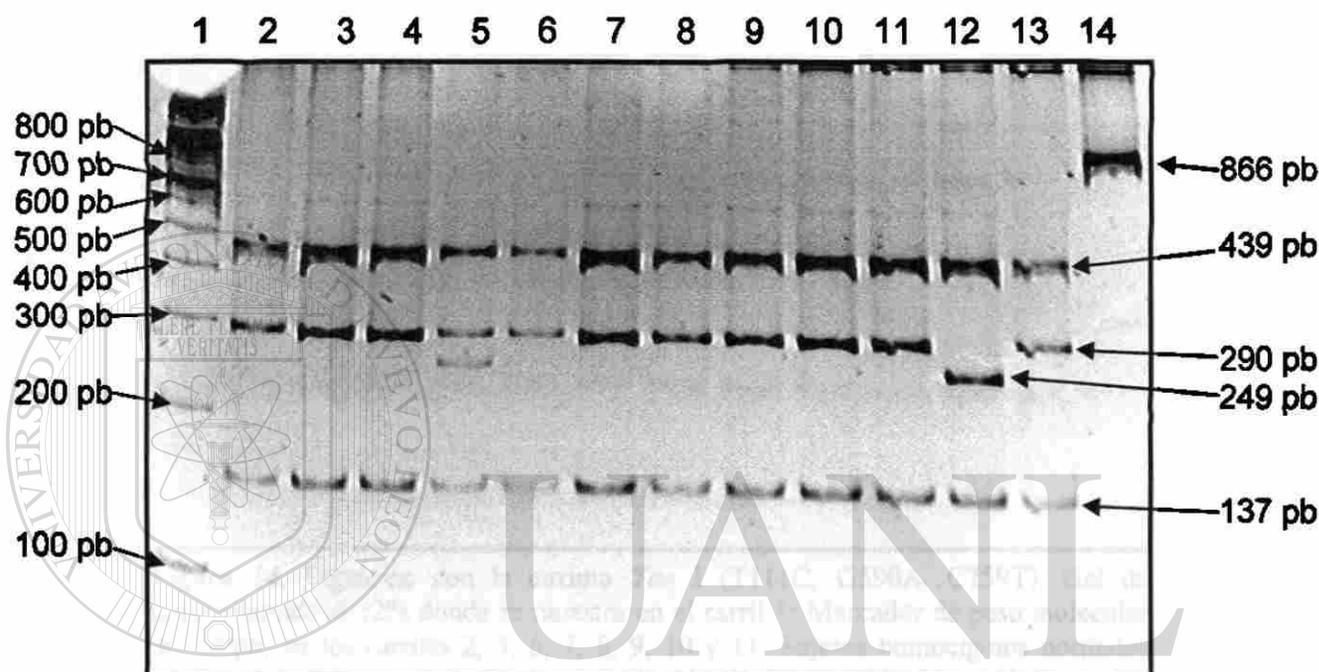
polimorfismos. En el polimorfismo G191A se esperaban los fragmentos de 801 pb y 65 pb, en donde el fragmento de 801 pb se generaba al perderse el sitio de corte de la enzima, uniéndose los fragmentos de 708 pb y 93 pb. Para el polimorfismo A434C se esperaba que se creara un sitio de corte para la enzima, en el fragmento de 708 pb del cual se iban a formar dos fragmentos de 464 pb y 244 pb, y por lo tanto se esperaban los fragmentos de 464 pb, 244 pb, 93 pb y 65 pb.



**Figura 12.** Digestión con la enzima *Msp* I (G191A, A434C). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2-11: Sujetos homocigotos normales donde se presentan tres fragmentos de 708 pb, 93 pb y 65 pb; y en el carril 12: Producto amplificado sin digerir.

La figura 13 muestra la digestión del producto amplificado de 866 pb con la enzima *Hinf* I para detectar el polimorfismo G857A. Los sujetos homocigotos normales presentan tres fragmentos de 439 pb, 290 pb y 137 pb. Los sujetos heterocigotos para el

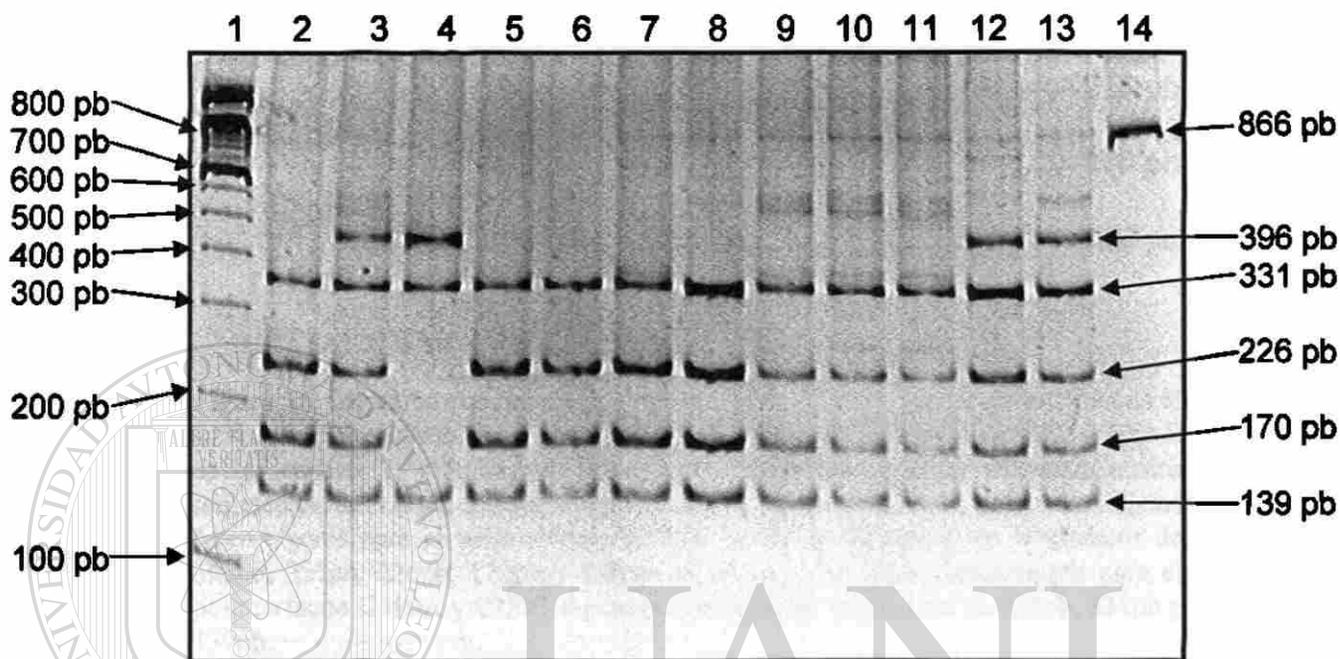
polimorfismo G857A presentan los tres fragmentos igual que el sujeto normal más otro fragmento de 249 pb. Los sujetos homocigotos para este polimorfismo presentan los fragmentos de 439 pb, 137 pb y el fragmento de 249 pb. El fragmento de 249 pb se forma al crearse un sitio de corte para la enzima *Hinf* I, el cual corta el fragmento de 290 pb en dos fragmentos uno de 249 pb y otro de 41 pb que no se alcanza a ver en el gel.



**Figura 13.** Digestión con la enzima *Hinf* I (G857A). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13: Sujetos homocigotos normales donde se presentan tres fragmentos de 439 pb, 290 pb y 137 pb; en el carril 5: Sujeto heterocigoto para el polimorfismo G857A donde se presentan los fragmentos de 439 pb, 290 pb, 249 pb y 137 pb; en el carril 12: Sujeto homocigoto para el polimorfismo G857A, donde se muestran los fragmentos de 439 pb, 249 pb, 137 pb y 41 pb (no se ve en el gel); y en el carril 14: Producto amplificado sin digerir.

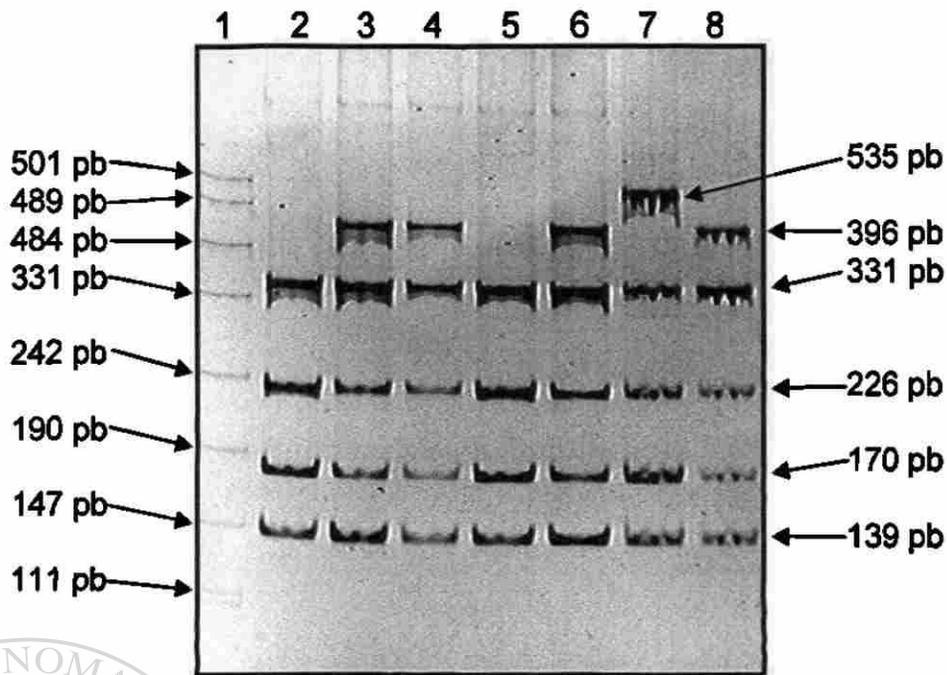
El gel de la figura 14 muestra la digestión del producto amplificado de 866 pb con la enzima *Taq* I para los polimorfismos T111C, G590A y C759T. Los sujetos homocigotos normales presentan cuatro fragmentos de 331 pb, 226 pb, 170 pb y 139 pb. Los sujetos heterocigotos para el polimorfismo G590A, además de presentar los cuatro fragmentos anteriores presentan otro de 396 pb. En los sujetos homocigotos para el

polimorfismo G590A los fragmentos de 396 pb, 331 pb y 139 pb están presentes. El fragmento de 396 pb se forma por la pérdida de un sitio de restricción para la enzima *Taq* I, uniéndose los fragmentos de 226 pb y 170 pb.



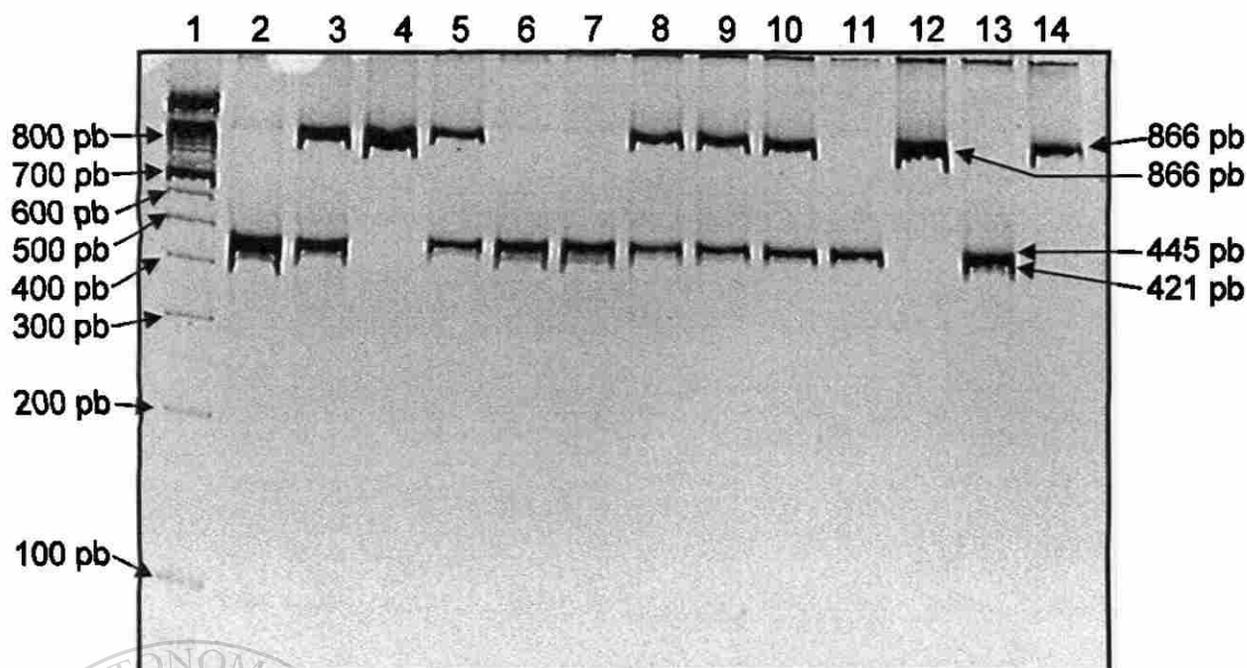
**Figura 14.** Digestión con la enzima *Taq* I (T111C, G590A, C759T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb; en los carriles 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11: Sujetos homocigotos normales donde se presentan cuatro fragmentos de 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en los carriles 3, 12 y 13: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo (G590A) donde se presentan los fragmentos de 396pb, 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en el carril 4: Sujeto homocigoto para el polimorfismo G590A donde se muestran los fragmentos de 396pb, 331pb y 139pb; y en el carril 14: Producto amplificado sin digerir.

Cuando los polimorfismos G590A y C759T se presentan en el mismo alelo (Figura 15), ambos eliminan sus respectivos sitios de corte para la enzima y por lo tanto los fragmentos 226 pb, 170 pb y 139 bp se unen formando un fragmento de 535 pb.



**Figura 15.** Digestión con la enzima *Taq* I (G590A, C759T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de pUC + *Msp* I; en los carriles 2, y 5: Sujetos homocigotos normales donde se presentan cuatro fragmentos de 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en los carriles 3, 4, 6 y 8: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo G590A donde se presentan los fragmentos de 396pb, 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en el carril 7: Sujeto heterocigoto para el polimorfismo G590A y C759T donde se muestran los fragmentos de 535pb, 331pb y 139pb.

El gel de la figura 16 muestra la digestión del producto amplificado de 866 pb con la enzima *Kpn* I para el polimorfismo C481T. Para los sujetos homocigotos normales para el polimorfismo C481T se esperaban dos fragmentos de 445 pb y 421 pb respectivamente, los cuales no se alcanzan a separar en el gel. Los sujetos heterocigotos para este polimorfismo presentan tres fragmentos de 866 pb, 445 pb y 421 pb. Los sujetos homocigotos con el polimorfismo C481T pierden el sitio de corte para la enzima *Kpn* I, por lo tanto esta enzima no corta el producto amplificado y se esperaba un fragmento de 866 pb.



**Figura 16.** Digestión con la enzima *Kpn* I (C481T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2, 6, 7, 11 y 13: Sujetos homocigotos normales donde se presentan los dos fragmentos de 445 pb y 421 pb (no se alcanzan a separar); en los carriles 3, 5, 8, 9 y 10: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo donde se presentan los fragmentos de 866 pb, 445 pb y 421 pb; en los carriles 4 y 12: Sujetos homocigotos para el polimorfismo C481T, donde se muestra el fragmento de 866 pb; y en el carril 14: Producto amplificado sin digerir.

#### 4.3.2 Identificación del polimorfismo T341C en el producto amplificado de

141 pb

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la figura 17 se muestra un gel con la digestión del producto amplificado de 141 pb con la enzima *Msp* A1 I para el polimorfismo T341C. Los sujetos homocigotos normales para este polimorfismo no tienen sitio de corte para la enzima, por lo tanto el fragmento esperado es igual al del producto amplificado de 141 pb. Los heterocigotos presentan tres fragmentos de 141pb, 122pb y 19pb. Los sujetos homocigotos para el polimorfismo T341C, se les crea un sitio de corte para la enzima presentando dos fragmentos de 122pb y 19pb (no se ve en el gel) y desaparece el de 141pb.



**Figura 17.** Digestión con la enzima *Msp* A1 I (T341C). Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 4, 5 y 11: Sujetos homocigotos normales donde se presenta el fragmento de 141 pb; en los carriles 2, 3, 7, 8, 9, 10 y 12: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo donde se presentan los fragmentos de 141 pb, 122 pb y 19 pb; en el carril 6: Sujeto homocigoto para el polimorfismo T341C, donde se muestran los fragmentos de 122 pb y 19 pb (no se ve en el gel); y en el carril 13: Producto amplificado sin digerir.

#### 4.3.3 Identificación del polimorfismo A803G en el producto amplificado de

##### 119 pb

El gel de la figura 18 muestra la digestión del producto amplificado de 119 pb con la enzima *Dde* I para el polimorfismo A803G. En los sujetos homocigotos normales para polimorfismo A803G no tiene sitio de corte para la enzima *Dde* I, por lo tanto el fragmento esperado es igual al del producto amplificado de 119 pb. Los heterocigotos presentan tres fragmentos de 119 pb, 97 pb y 22 pb. Los sujetos homocigotos para el

polimorfismo A803G, se les origina un sitio de corte debido a este polimorfismo para la enzima presentando dos fragmentos de 97 pb y 22 pb (no se ve en el gel).



**Figura 18.** Digestión con la enzima *Dde* I (A803G). Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 3, y 8: Sujetos homocigotos normales donde se presenta el fragmento de 119 pb; en los carriles 4, 5, 7 y 9: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo A803G donde se presentan tres fragmentos de 119 pb, 97 pb y 22 pb; en los carriles 2 y 6: Sujetos homocigotos para el polimorfismo A803G donde se muestran los fragmentos de 97 pb y 22 pb (no se ve en el gel); y en el carril 10: pBS digerido con *Dde* I como patrón de corte.

#### 4.4 Análisis de la presencia de los polimorfismos en cada una de las muestras.

De los gels anteriores se obtuvieron las frecuencias de los polimorfismos en la población estudiada. Como se muestra en la tabla XXIII solamente 8 de los 11 polimorfismos estudiados se encontraron en esta población.

**Tabla XXIII.** Frecuencia de los polimorfismos en la población de estudio.

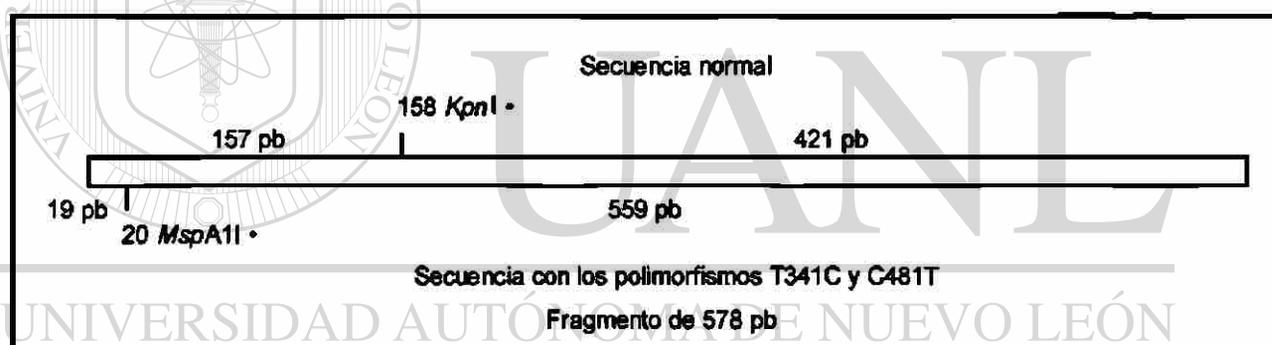
Polimorfismo	Homocigoto Normal (N/N)	Heterocigotos (N/P)	Homocigoto para el polimorfismo (P/P)
T111C	104 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
G191A	104 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
C282T	53 (51.0%)	43 (41.3%)	8 (7.7%)
T341C	44 (42.3%)	46 (44.2%)	14 (13.5%)
A434C	104 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
C481T	48 (46.2%)	42 (40.4%)	14 (13.4%)
G590A	76 (73.1%)	24 (23.1%)	4 (3.8%)
C759T	103 (99%)	1 (1%)	0
A803G	40 (38.5%)	46 (44.2%)	18 (17.3%)
A845C	104 (100%)	0	0
G857A	80 (76.9%)	23 (22.1%)	1 (1%)

#### 4.5 Genotipificación.

Al conocer los polimorfismos presentes en cada individuo, se les pudo asignar los alelos que les correspondían, utilizando la nomenclatura existente (tabla I). Como en esta nomenclatura a cada alelo le corresponde un polimorfismo o una combinación de polimorfismos, solamente los individuos que eran homocigotos, homocigotos más un solo polimorfismo heterocigoto y heterocigotos de un solo polimorfismo, se podían asignar los alelos. Para los individuos que no presentaban las características anteriores, lo cual fue muy frecuente como puede observar en la tabla XXIV, la asignación de alelos se realizó determinando cuales polimorfismos correspondían a cada alelo.

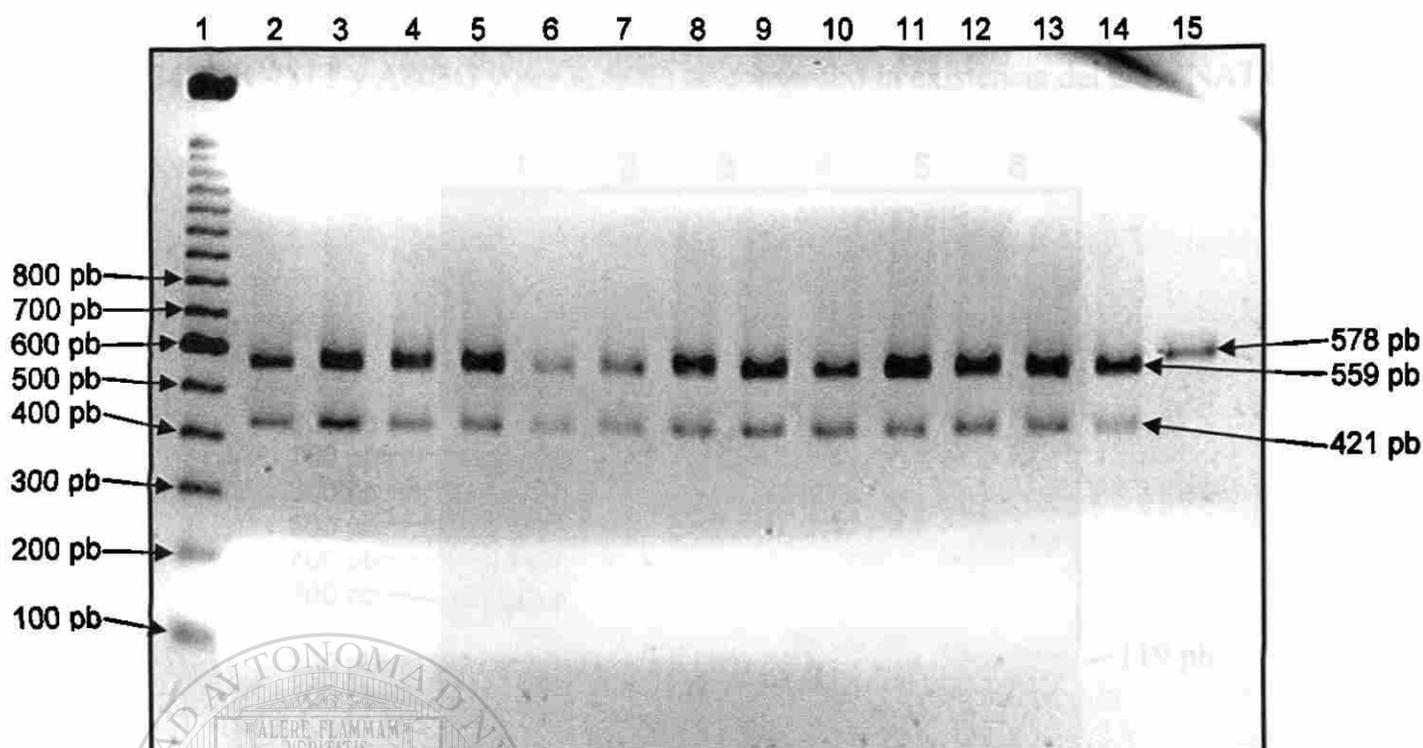
Cuando el alelo NAT2\*5B se encontraba junto con los alelos NAT2\*4, NAT2\*6A, NAT2\*6B, NAT2\*6C, NAT2\*7B, NAT12\*A, NAT2\*12B en una persona heterocigota, se procedió a identificar si los polimorfismos T341C, C481T y A803G que conforman el alelo NAT2\*5B se encontraban en el mismo alelo. Para comprobar que se encontraban juntos se digirió el fragmento de 578 pb (figura 8) con las enzimas *Kpn* I y *Msp* A1 I (figura 21), para determinar que los polimorfismos (T341C y C481T) estaban en el mismo alelo.

Como se observa en la figura 19 el alelo con la secuencia normal lo corta la enzima *Kpn* I en dos fragmentos de 421 pb y 157 pb (no se ve en el gel), debido a que no contenía el polimorfismo C481T.



**Figura 19.** Fragmento de 578 pb digerido con las enzimas *Kpn* I (C481T) y *Msp* A1 I (T341C). En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no tener el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I corta el fragmento de 578 pb, y al no encontrarse el polimorfismo T341C la enzima *Msp* A1 I no corta este fragmento. La secuencia con los polimorfismos C481T y T341C (parte inferior), se observa que al tener el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I no corta el fragmento de 578 pb, y al encontrarse el polimorfismo T341C la enzima *Msp* A1 I corta este fragmento.

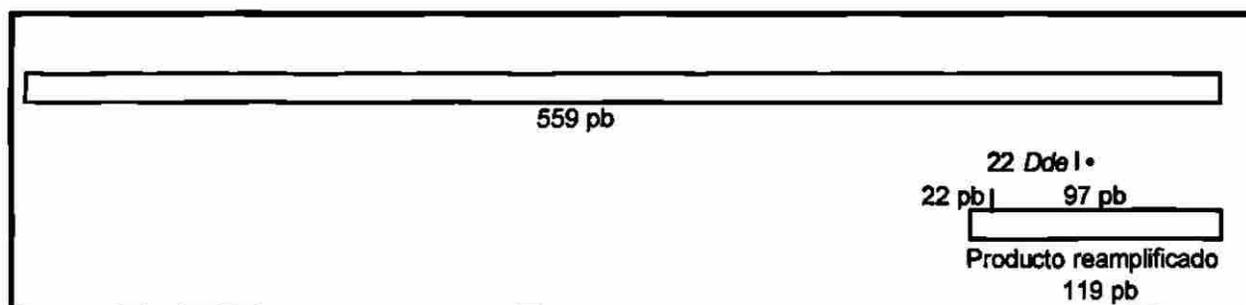
El alelo NAT2\*5B al tener el polimorfismo (C481T) la enzima *Kpn* I no cortaría el fragmento, quedando de 578 pb, pero si el polimorfismo T341C se encontraba en el mismo alelo, la enzima *Msp* A1 I debería cortar el fragmento de 578 pb que no cortó la enzima *Kpn* I en dos fragmentos de 559 pb y 19 pb (figuras 19 y 20).



**Figura 20.** Digestión con las enzimas *Kpn* I (C481T) y *Msp* A1 I (T341C). Gel de agarosa al 1.5% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-14: Sujetos con ambos polimorfismos en el mismo alelo donde se presentan los fragmentos de 559 pb y 19 pb (no se ve en el gel), los fragmentos de 421 pb y 157 pb (no se ve en el gel) son parte del otro alelo; y en el carril 15: producto amplificado sin digerir.

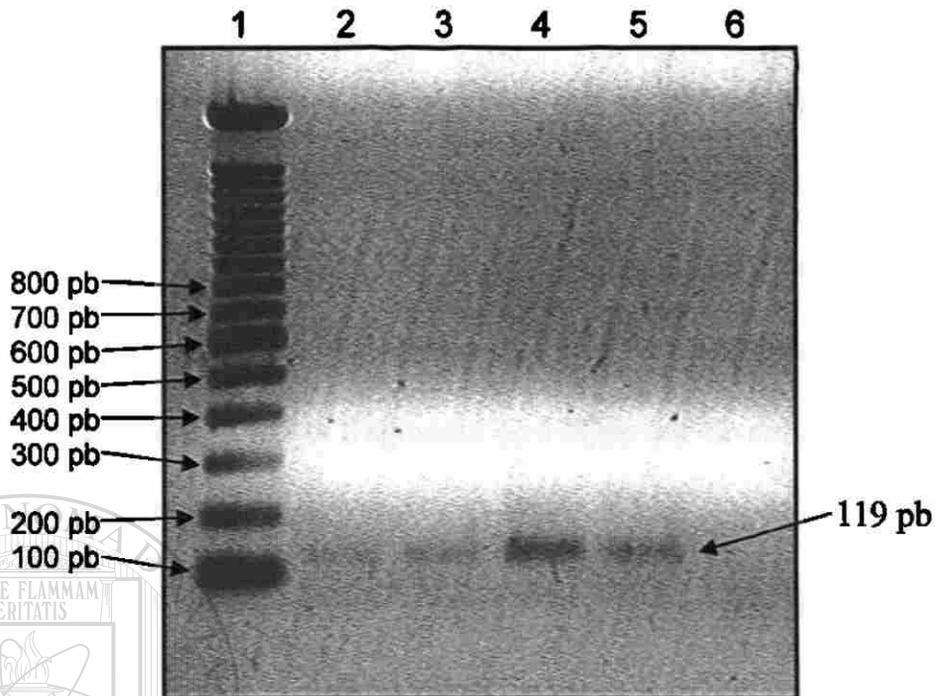
Posteriormente se recuperó la banda de 559 pb del gel (figura 20) y se reamplificó

el fragmento de 119 pb como se ve en la figura 22, en el cual se buscaba el polimorfismo A803G con la enzima *Dde* I (figura 23), donde se esperaban los fragmentos de 97 pb y 22 pb (figura 21).

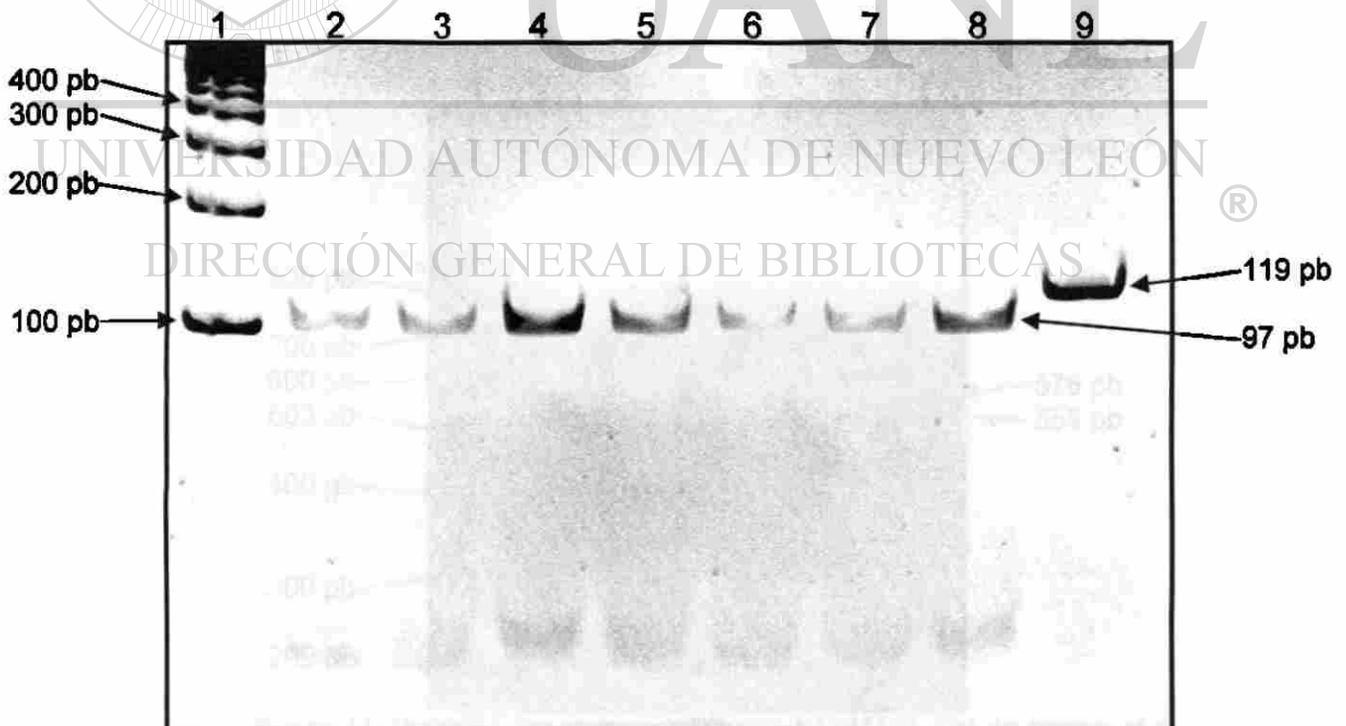


**Figura 21.** Secuencia recuperada del gel con el polimorfismo A803G, reamplificada y digerida con la enzima *Dde* I (A803G). En la figura se observa el fragmento reamplificado de 119 pb, que al tener el polimorfismo A803G la enzima *Dde* I lo corta en dos fragmentos de 22 pb y 97 pb.

De esta manera se demostró que en el mismo alelo estaban los polimorfismos T341C, C481T y A803G y por lo tanto se comprobó la existencia del alelo NAT2\*5B.



**Figura 22.** Producto reamplificado de 119 pb. Gel de agarosa al 2% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-5: Producto reamplificado de 119 pb y en el carril 6: Control negativo.



**Figura 23.** Digestión con la enzima *Dde* I (A803G). Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 3-8: Sujetos que presentan el polimorfismo A803G donde se muestran los fragmentos de 97 pb y 22 pb (no se ve en el gel); y en el carril 9: Producto reamplificado sin digerir.

Cuando los alelos NAT2\*5A y NAT2\*4 estaban en la misma muestra se identificaron digiriendo el fragmento de 578 pb con las enzimas *Kpn* I y *Msp* A1 I (figuras 19 y 20), para determinar que los polimorfismos T341C y C481T que integran el alelo NAT2\*5A estaban juntos. Se esperaba que la enzima *Kpn* I cortara al alelo NAT2\*4 en dos fragmentos de 421 pb y 157 pb, debido a que no contenía el polimorfismo C481T y al alelo NAT2\*5A por tener el polimorfismo no lo cortaría y quedaría de 578 pb. Pero si el polimorfismo T341C se encontraba en este alelo, la enzima *Msp* A1 I debería cortar el fragmento de 578 pb que no cortó la enzima *Kpn* I en dos fragmentos de 559 pb y 19 pb.

Para identificar el alelo NAT2\*5C del alelo NAT2\*4 se digirió el fragmento de 578 pb con la enzima *Msp* A1 I (figura 19, parte inferior), donde se esperaba que al alelo NAT2\*5C lo cortara en dos fragmentos de 559 pb y 19 pb y al alelo NAT2\*4 no lo cortara por no tener el polimorfismo T341C (figura 24).

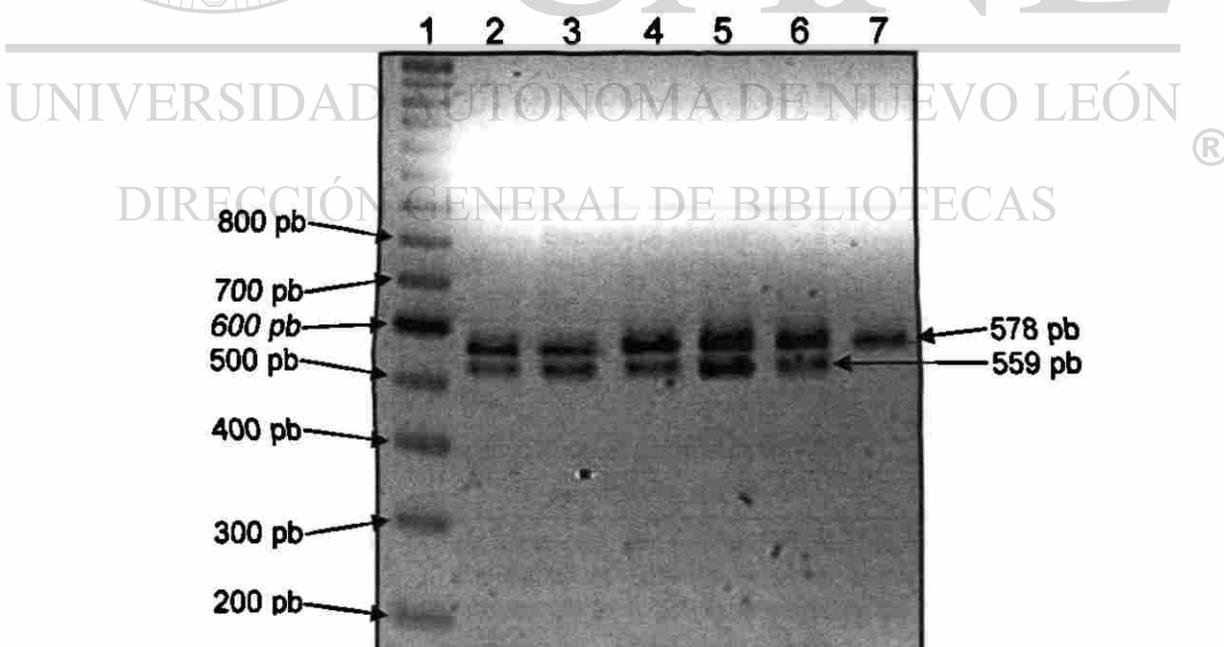
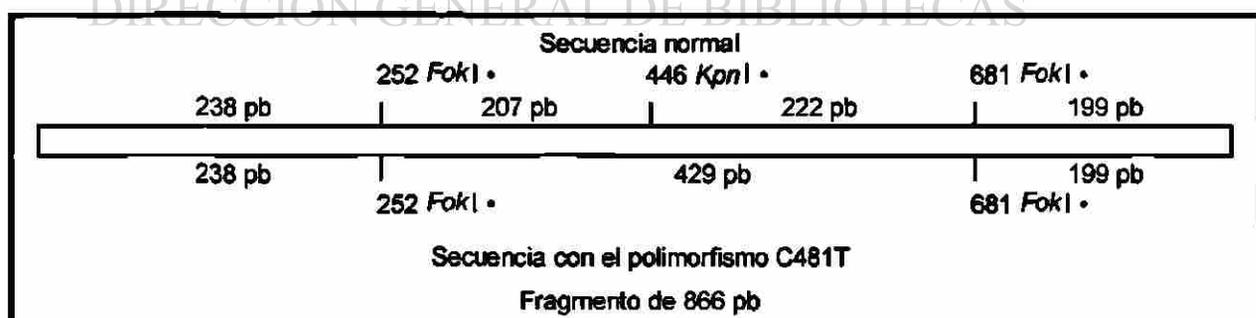


Figura 24. Digestión con la enzima *Msp* A1 I (T341C). Gel de agarosa al 1.5% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-6: Sujetos con el polimorfismo donde se presentan los fragmentos de 559 pb y 19 pb (no se ve en el gel), el fragmento de 578 pb es el alelo NAT2\*4; y en el carril 7: producto amplificado sin digerir.

Después se recuperó la banda de 559 pb del gel (figuras 21 y 24) con mucho cuidado de no traerse la banda de 578 pb y se reamplificó el fragmento de 119 pb como se ve en la figura 22, en el cual se buscaba el polimorfismo A803G con la enzima *Dde* I (figura 23), donde se esperaban los fragmentos de 97 pb y 22 pb. Por lo tanto se demostró que estaban los polimorfismos T341C y A803G juntos formando el alelo NAT2\*5C.

Para identificar los alelos NAT2\*6A y NAT2\*5B en individuos heterocigotos para estos alelos, se realizó primero la identificación del alelo NAT2\*5B, la cual ya se mencionó anteriormente. Para comprobar que los polimorfismos C282T y G590A estaban formando el alelo NAT2\*6<sup>a</sup>, se realizaron dos dobles digestiones del fragmento de 866 pb, una doble digestión fue con las enzimas *Kpn* I para identificar el polimorfismo C481T y con *Fok* I para identificar el polimorfismo C282T. Esta doble digestión se hizo para demostrar que ambos polimorfismos se encontraban en diferentes alelos. La doble digestión del fragmento de 866 pb de un alelo normal genera cuatro fragmentos de 238 pb, 222 pb, 207 pb y 199 pb (figura 25, parte superior).



**Figura 25.** Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas *Fok* I (C282T) y *Kpn* I (C481T), para identificar el polimorfismo C481T. En ambas secuencias se observa que al no tener el polimorfismo C282T la enzima *Fok* I corta el fragmento de 866 pb en la posición de 252 pb, y además, en ambas secuencias existe un sitio de corte para la enzima *Fok* I en la posición de 681 pb. En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no encontrarse el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I corta este fragmento. En la secuencia con el polimorfismo C481T (parte inferior), se observa que al encontrarse el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I no corta este fragmento.

Como se muestra en el gel de la figura 27 y el esquema de la figura 25, el fragmento de 866 pb que contenía el polimorfismo C481T del alelo NAT2\*5B se digirió con las enzimas *Fok* I y *Kpn* I, esperando tres fragmentos de 429 pb, 238 pb y 199 pb. El fragmento de 429 pb se genera porque la enzima *Kpn* I pierde su sitio de corte debido al polimorfismo C481T.

En la figura 26 se muestra que el otro fragmento donde está el polimorfismo C282T del alelo NAT2\*6A se esperaba que las enzimas lo cortaran también en tres fragmentos de 445 pb, 222 pb y 199 pb, el fragmento de 445 pb se genera porque la enzima *Fok* I pierde su sitio de corte debido al polimorfismo C282T.

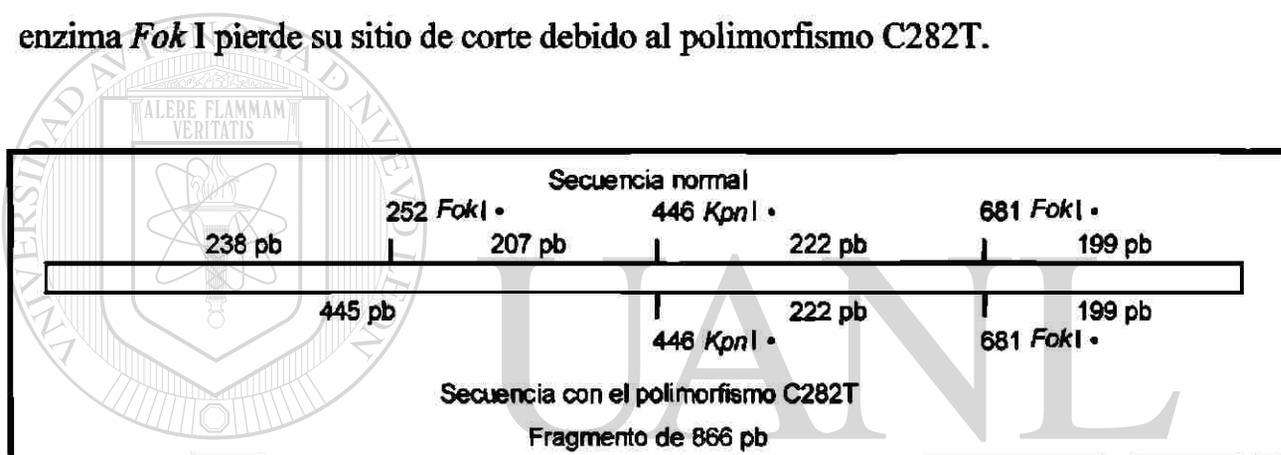


Figura 26. Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas *Fok* I (C282T) y *Kpn* I (C481T), para identificar el polimorfismo C282T. En ambas secuencias se observa que al no encontrarse el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I corta este fragmento, y además, en ambas secuencias existe un sitio de corte para la enzima *Fok* I en la posición de 681 pb. En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no tener el polimorfismo C282T la enzima *Fok* I corta el fragmento de 866 pb en la posición de 252 pb. En la secuencia con el polimorfismo C282T (parte inferior), se observa que al tener el polimorfismo C282T la enzima *Fok* I no corta el fragmento de 866 pb en la posición de 252 pb.

En el carril 12 del gel de la figura 27 se corrió una muestra que contenía los alelos NAT2\*4 y NAT2\*6A para demostrar que la banda de 429 pb queda arriba de la banda de 445 pb. En el alelo NAT2\*4 se obtuvieron los cuatro fragmentos esperados de 238 pb, 222 pb, 207 pb y 199 pb cuando se digirió con las enzimas *Kpn* I y *Fok* I. Como ya se mencionó, cuando en el alelo con el polimorfismo C282T se digirió se obtienen tres fragmentos de 445 pb, 222 pb y 199 pb, y como estos alelos solamente generan la

banda de 445 pb al digerirse, se puede ver en el gel de la figura 27 que por alguna razón la banda de 429 pb corre mas arriba que la banda de 445 pb. La banda de 429 pb siempre corre de la misma manera (figura 11).



Figura 27. Digestión con las enzimas *Fok* I (C282T) y *Kpn* I (C481T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-11: Sujetos con los polimorfismos en diferentes alelos donde el alelo con el polimorfismo C282T presentan tres fragmentos de 445 pb, 222 pb y 199 pb y el alelo con el polimorfismo C481T también presenta tres fragmentos de 429 pb, 238 pb y 199 pb; en el carril 12: Sujeto con el alelo normal donde se presentan cuatro bandas de 238 pb, 235 pb, 207 pb y 199 pb y el alelo con el polimorfismo C282T donde se presentan tres fragmentos de 445 pb, 222 pb y 199 pb; y en el carril 13: Producto amplificado sin digerir.

Al presentarse los dos fragmentos de 445 pb y 429 pb en la misma muestra se comprueba que los polimorfismos C282T y C481T están en diferentes alelos y por lo tanto el polimorfismo C282T pertenece al alelo NAT2\*6A. Se continuó con el polimorfismo G590A para comprobar que también pertenece al alelo NAT2\*6A. Para esto se realizó otra doble digestión con las enzimas *Kpn* I y *Taq* I (figura 30) en el fragmento de 866 pb para comprobar que los polimorfismos C481T y G590A estaban en

diferentes alelos. La doble digestión del fragmento de 866 pb de un alelo normal genera cinco fragmentos de 331 pb, 170 pb, 139 pb, 114 pb y 112 pb (figura 28).

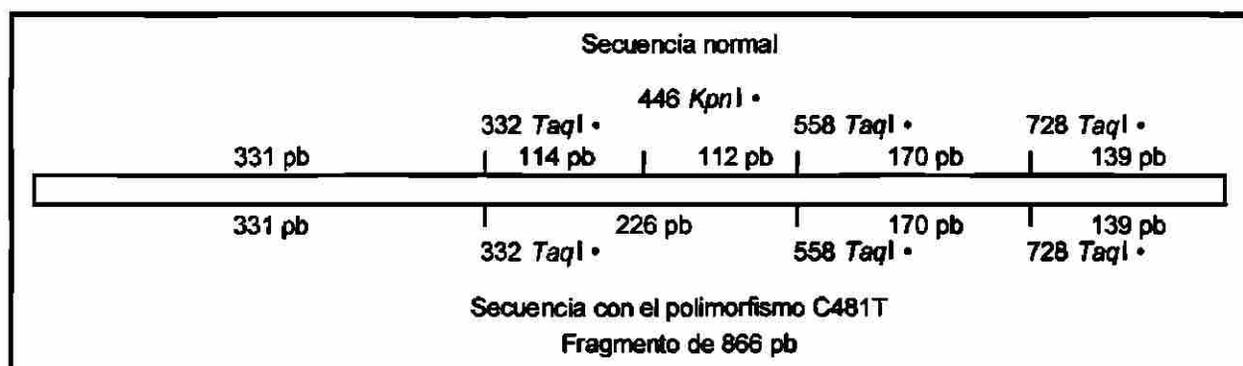


Figura 28. Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas *Kpn* I (C481T) y *Taq* I (G590A), para identificar el polimorfismo C481. En ambas secuencias se observa que al no encontrarse el polimorfismo G590A la enzima *Taq* I corta este fragmento en la posición de 558 pb, y además, en ambas secuencias existen dos sitios de corte para la enzima *Taq* I en las posiciones 332 pb y 728 pb. En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no tener el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I corta el fragmento de 866 pb. En la secuencia con el polimorfismo C481T (parte inferior), se observa que al tener el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I no corta el fragmento de 866 pb.

El fragmento de 866 pb que contenía el polimorfismo C481T del alelo NAT2\*5B al digerirse con la enzimas *Kpn* I y *Taq* I generó cuatro fragmentos de 331 pb, 226 pb, 170 pb y 139 pb, el fragmento de 226 pb se generó porque la enzima *Kpn* I pierde el sitio de corte al presentarse el polimorfismo C481T (figura 28).

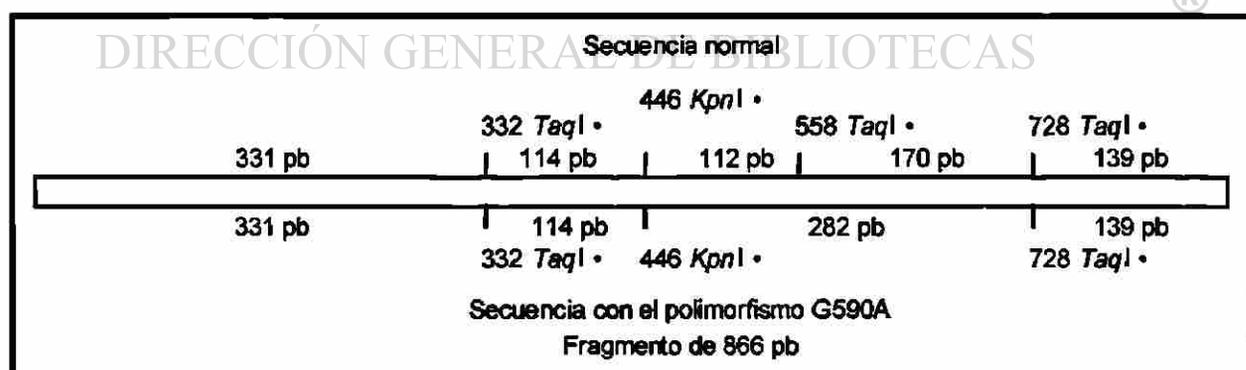
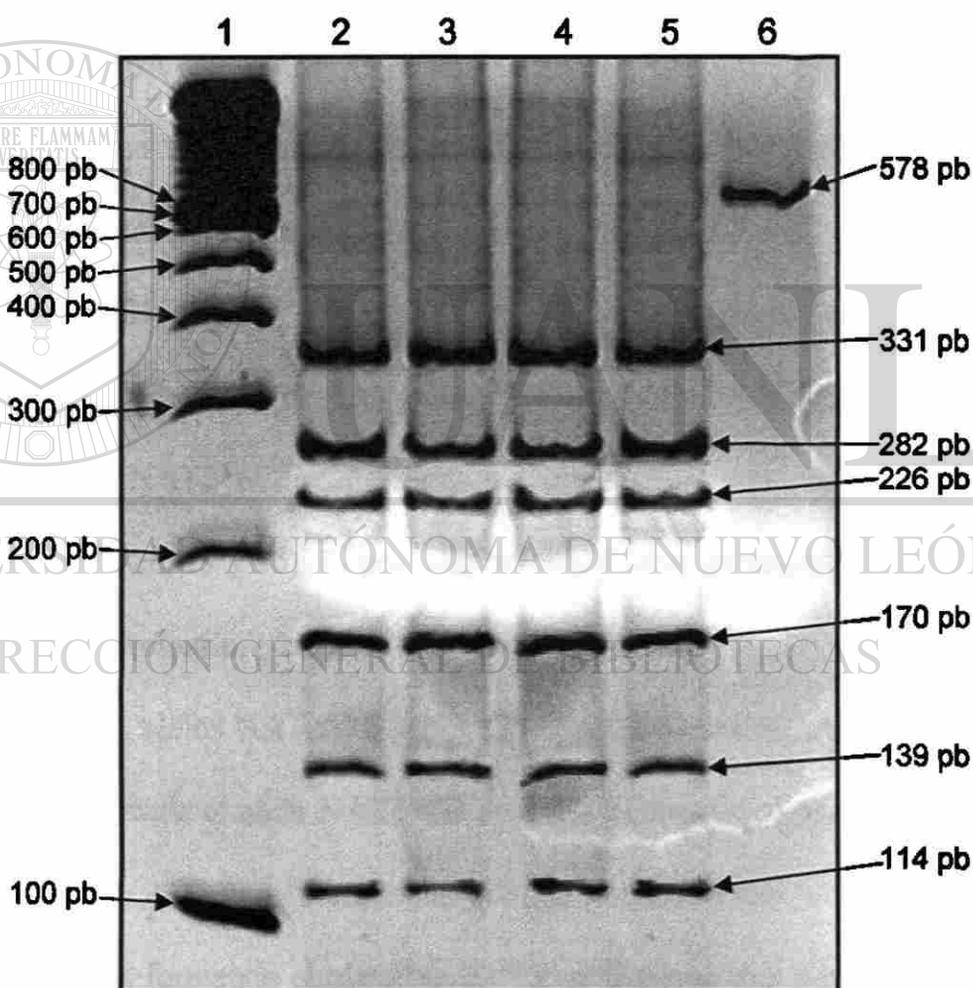


Figura 29. Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas *Kpn* I (C481T) y *Taq* I (G590A), para identificar el polimorfismo G590A. En ambas secuencias se observa que al no tener el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I corta el fragmento de 866 pb, y además, en ambas secuencias existen dos sitios de corte para la enzima *Taq* I en las posiciones 332 pb y 728 pb. En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no encontrarse el polimorfismo G590A la enzima *Taq* I corta este fragmento en la posición de 558 pb. En la secuencia con el polimorfismo G590A (parte inferior), se observa que al encontrarse el polimorfismo G590A la enzima *Taq* I no corta este fragmento en la posición de 558 pb.

En el otro fragmento con el polimorfismo G590A del alelo NAT2\*6A se esperaban de la digestión también cuatro fragmentos de 331 pb, 282 pb, 139 pb y 114 pb (figura 29, parte inferior). El fragmento de 282 pb se formó al perderse el sitio de corte para la enzima *Taq* I al estar presente el polimorfismo G590A.

Al estar presentes los dos fragmentos de 282 pb y 226pb en la misma muestra se comprueba que los polimorfismos C481T y G590 están en diferentes alelos y por lo tanto el polimorfismo G590A pertenece al alelo NAT2\*6A.



**Figura 30.** Digestión con las enzimas *Kpn* I (C481T) y *Taq* I (G590A). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-5: Sujetos con los polimorfismos en diferentes alelos donde el alelo con el polimorfismo C481T presentan cuatro fragmentos de 331 pb, 226 pb, 170 pb y 139 pb y el alelo con el polimorfismo G590A también presenta cuatro fragmentos de 331 pb, 282 pb, 139 pb y 114 pb; y en el carril 6: Producto amplificado sin digerir.

Como se puede observar en el gel de la figura 30, los dos polimorfismos C282T y G590A no estaban en el alelo NAT2\*5B donde se encuentra el polimorfismo C481T, por lo tanto se encuentran juntos formando el alelo NAT2\*6A.

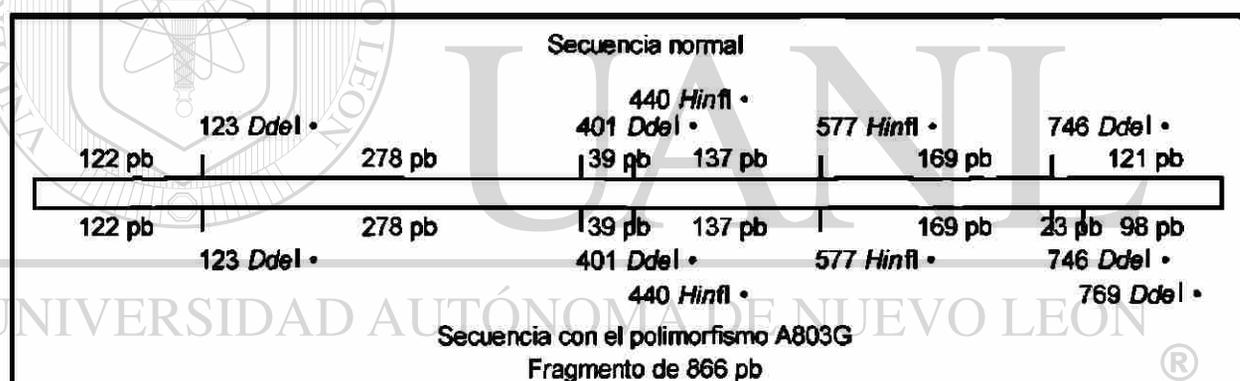
Cuando el individuo era heterocigoto para los alelos NAT2\*6B y NAT2\*5B, se realizó primero la identificación del alelo NAT2\*5B, la cual ya se mencionó anteriormente (figuras 19, 20, 21, 22 y 23). Para comprobar que el polimorfismo G590A que pertenece al alelo NAT2\*6B no se encontraba junto con los polimorfismos de NAT2\*5B, se realizó el mismo procedimiento para determinar este mismo polimorfismo en el alelo NAT2\*6A (figuras 28, 29 y 30).

Al encontrar en la muestra los alelos NAT2\*6C y NAT2\*5B se identificaron haciendo digestiones para comprobar que los polimorfismos T341C y C481T estaban en el alelo NAT2\*5B (figuras 19 y 20), de la misma manera como se mencionó anteriormente. Para saber que los polimorfismos C282T y G590A se encontraban formando el alelo NAT2\*6C, se digirieron de la misma manera que el alelo NAT2\*6A (figura 25, 26, 27, 28, 29 y 30). El polimorfismo A803G al pertenecer a ambos alelos no fue necesario determinarlo.

Cuando los alelos NAT2\*7B y NAT2\*5B se encontraban en la misma muestra, primero se identificaba el alelo NAT2\*5B como ya se mencionó anteriormente (figuras 19, 20, 21, 22 y 23). Para comprobar que los polimorfismo C282T y G857A se encontraban juntos formando el alelo NAT2\*7B se hicieron dos dobles digestiones. La primera doble digestión fue con las enzimas *Fok* I y *Kpn* I para identificar los polimorfismos C282T y C481T, respectivamente. Esta digestión fue igual a la del alelo NAT2\*6A para identificar el polimorfismo C282T (figuras 25, 26 y 27). La segunda

digestión se realizó con las enzimas *Dde* I y *Hinf* I para identificar los polimorfismos A803G y G857A, respectivamente.

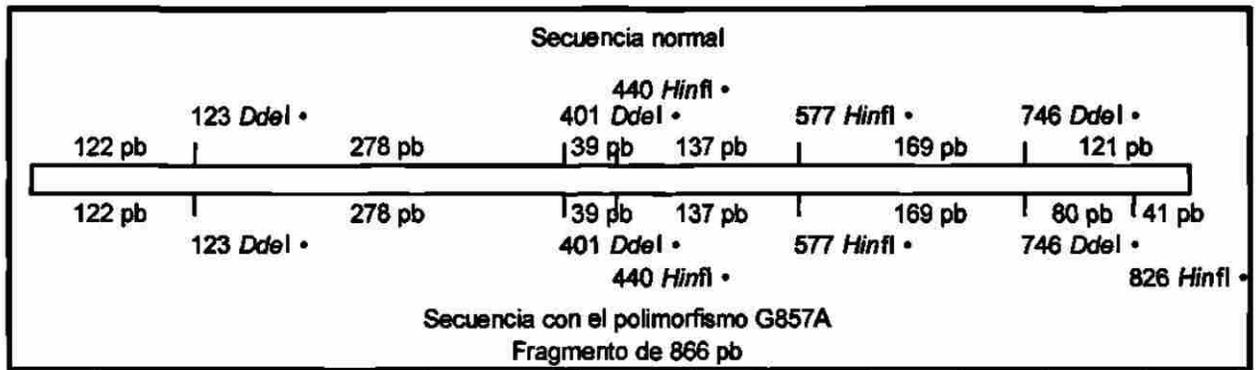
En la figura 31 se muestra el fragmento de 866 pb con la secuencia del alelo normal, que al digerirse con las enzimas *Dde* I y *Hinf* I genera seis fragmentos de 278 pb, 169 pb, 137 pb, 122 pb, 121 pb y 39 pb. Como se ve en el gel de la figura 33 y en el esquema de la figura 31 (parte inferior) la digestión de las enzimas del fragmento de 866 pb con el polimorfismo A803G genera siete fragmentos de 278 pb, 169 pb, 137 pb, 122 pb, 98 pb, 39 pb y 23 pb, los fragmentos de 98 pb y 23 pb se forman al crearse un sitio de corte en el fragmento de 121 pb para la enzima *Dde* I al estar presente el polimorfismo A803G.



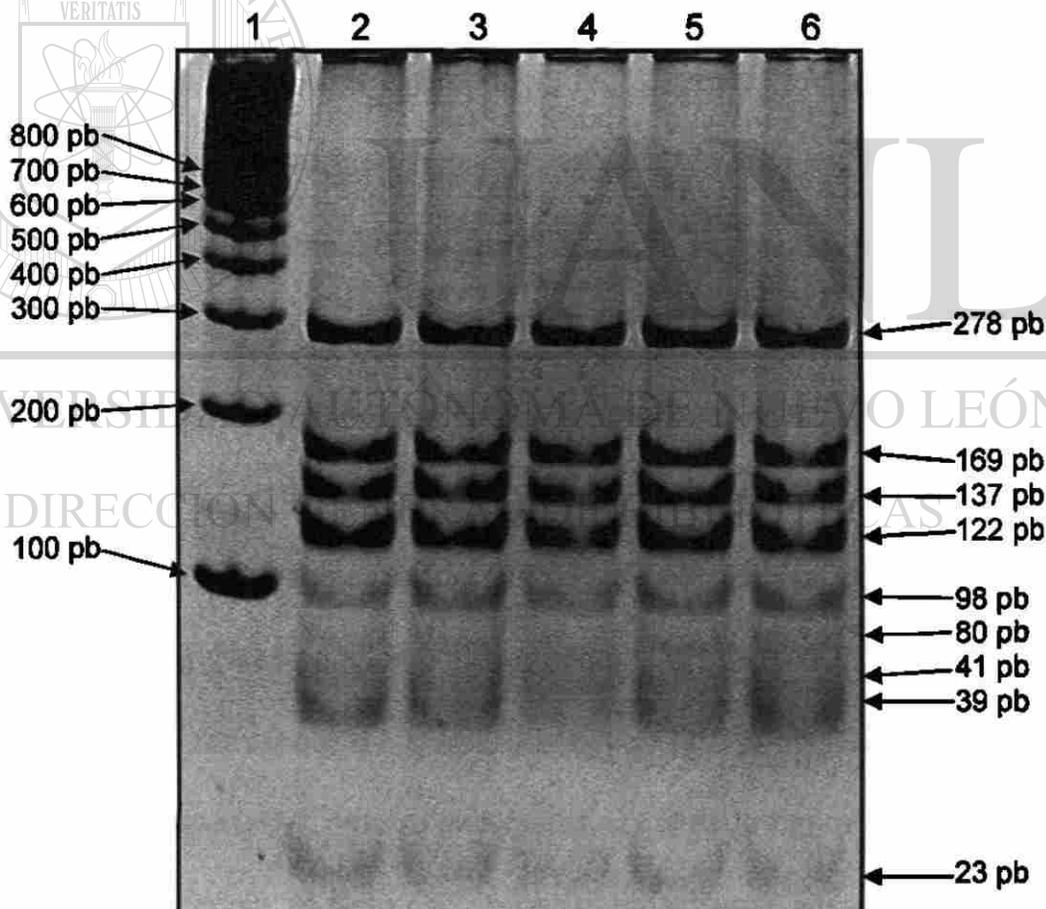
**Figura 31.** Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas *Dde* I (A803G) y *Hinf* I (G857A), para identificar el polimorfismo A803G. En ambas secuencias se observa que al no encontrarse el polimorfismo G857A la enzima *Hinf* I no corta este fragmento en la posición de 826 pb, y además, en ambas secuencias existen tres sitios de corte para la enzima *Dde* I en las posiciones 123 pb, 401 pb y 746 pb y dos sitios de corte para la enzima *Hinf* I en las posiciones 440 pb y 577 pb. En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no tener el polimorfismo A803G la enzima *Dde* I no corta el fragmento de 866 pb en la posición de 769 pb. En la secuencia con el polimorfismo A803G (parte inferior), se observa que al tener el polimorfismo la enzima *Dde* I corta el fragmento de 866 pb en la posición de 769 pb.

La digestión del fragmento de 866 pb con el polimorfismo G857A genera siete bandas de 278 pb, 169 pb, 137 pb, 122 pb, 80 pb, 41 pb y 39 pb (figura 32).

Los fragmentos de 80 pb y 41 pb se generan del fragmento de 121 pb debido a que al estar presente el polimorfismo G857A crea un sitio de corte para la enzima *Hinf* I.



**Figura 32.** Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas *Dde I* (A803G) y *Hinf I* (G857A), para identificar el polimorfismo G857A. En ambas secuencias se observa que al no tener el polimorfismo A803G la enzima *Dde I* no corta el fragmento de 866 pb en la posición de 769 pb, y además, en ambas secuencias existen tres sitios de corte para la enzima *Dde I* en las posiciones 123 pb, 401 pb y 746 pb y dos sitios de corte para la enzima *Hinf I* en las posiciones 440 pb y 577 pb. En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no encontrarse el polimorfismo G857A la enzima *Hinf I* no corta este fragmento en la posición de 826 pb. En la secuencia con el polimorfismo A803G (parte inferior), se observa que al encontrarse el polimorfismo G857A la enzima *Hinf I* corta este fragmento en la posición de 826 pb.



**Figura 33.** Digestión con las enzimas *Dde I* (A803G) y *Hinf I* (G857A). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-6: Sujetos con los polimorfismos en diferentes alelos donde el alelo con el polimorfismo A803G presentan siete fragmentos de 278 pb, 169 pb, 137 pb, 122 pb, 98 pb, 39 pb y 23 pb y el alelo con el polimorfismo G857A también presenta siete fragmentos de 278 pb, 169 pb, 137 pb, 122 pb, 80 pb, 41 pb y 39 pb.

Como se ve en los geles de las figuras 27 y 33, los dos polimorfismos C282T y G857A no estaba en el alelo NAT2\*5B donde se encuentran los polimorfismo C481T y A803G. Esto quiere decir que se encuentran formando el alelo NAT2\*7B.

A una persona que era heterocigota para los alelos NAT2\*12A y NAT2\*5B, solamente se les identificaban los polimorfismos T341C y C481T alelo NAT2\*5B como se muestra en el gel de la figura 21 y los esquemas de las figuras 19 y 20, debido a que el polimorfismo A803G que forma el alelo NAT2\*12A se encuentra en ambos alelos.

Cuando una persona era heterocigota para los alelos NAT2\*12B y NAT2\*5B, primero se identificaban los polimorfismos T341C y C481T alelo NAT2\*5B como se muestra en el gel de la figura 21 y los esquemas de las figuras 19 y 20. El alelo NAT2\*12B se identificó haciendo una doble digestión para identificar el polimorfismo C282T de la misma manera como se realizó para identificarlo en NAT2\*6A (figuras 26, 27, 28 y 29). El polimorfismo A803G se encuentra en ambos alelos y por lo tanto no fue necesario determinarlo.

También se encontró la combinación de polimorfismos C282T y C481T a quien Myron Gross y cols.<sup>49</sup> le designaron el nombre de alelo NAT2\*13B. Para determinar si estos polimorfismos estaban juntos formando este alelo, se hizo una doble digestión con las enzimas *Kpn* I y *Fok* I para los polimorfismos C481T y C282T, respectivamente. La digestión del alelo normal nos dio cuatro fragmentos de 238 pb, 222 pb, 207 pb y 199 pb (figura 34, parte superior). Como se observa en el gel de la figura 35 y el esquema de la figura 34 (parte inferior), el alelo con ambos polimorfismos nos dio dos fragmentos de 667 pb y 199 pb. El fragmento de 667 pb se genera cuando los fragmentos de 238 pb, 222 pb y 207 pb se unen debido a que las enzimas *Kpn* I y *Fok* I pierden su sitio de corte al estar presentes los polimorfismos C481T y C282T, respectivamente.

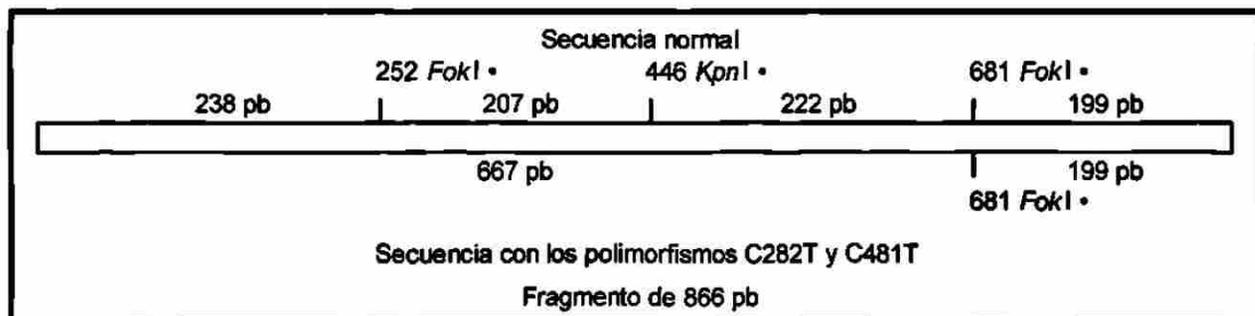


Figura 34. Fragmento de 866 pb digerido con las enzimas *Fok I* (C282T) y *Kpn I* (C481T), para identificar los polimorfismos C282T y C481T. En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no tener el polimorfismo C282T la enzima *Fok I* corta el fragmento de 866 pb en la posición de 252 pb y al no encontrarse el polimorfismo C481T la enzima *Kpn I* corta este fragmento. En la secuencia con los polimorfismos C282T y C481T (parte inferior), se observa que al tener el polimorfismo C282T la enzima *Fok I* no corta el fragmento de 866 pb en la posición de 252 pb, y al encontrarse el polimorfismo C481T la enzima *Kpn I* no corta este fragmento. En ambas secuencias existe un sitio de corte para la enzima *Fok I* en la posición de 681 pb.

Como se observa en el gel figura 35, estos polimorfismos se encuentran en el mismo alelo, por lo tanto esta persona es heterocigota para el alelo NAT2\*13B y NAT2\*4.

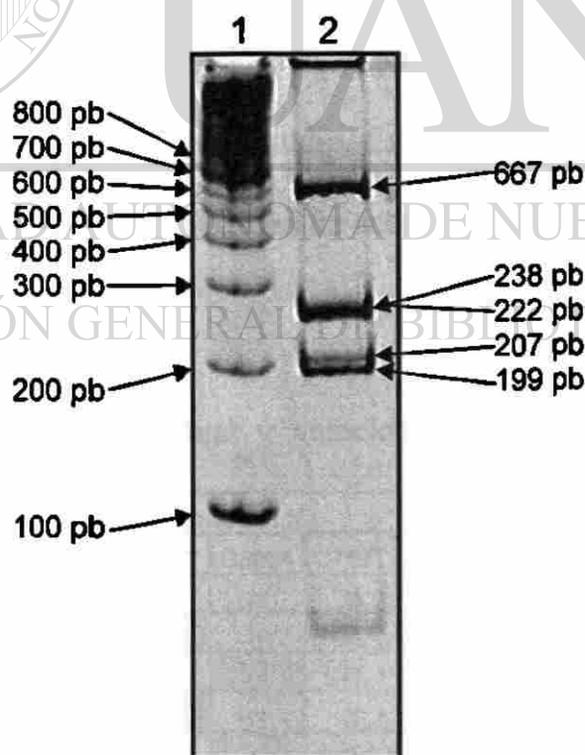


Figura 35. Digestión con las enzimas *Fok I* (C282T) y *Kpn I* (C481T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en el carril 2: Sujeto heterocigoto para los alelos NAT2\*13B y NAT2\*4 donde se muestran los fragmentos del alelo NAT2\*13B de 667 pb y 199 pb y los fragmentos del alelo NAT2\*4 de 238 pb, 222 pb, 207 pb y 199 pb.

Adicionalmente se encontró la combinación de polimorfismos G590A, C759T y A803G que no había sido reportada. Se comprobó que los polimorfismos G590A y C759T se presentaban en el mismo alelo (Figura 15), porque ambos polimorfismos eliminan sus respectivos sitios de corte para la enzima *Taq* I y por lo tanto los fragmentos 226 pb, 170 pb y 139 pb se unen formando un fragmento de 535 pb. El polimorfismo A803G se encontraba en ambos alelos, por lo cual no fue necesario determinar en cual alelo se encontraba. De lo anterior se comprueba que los polimorfismos G590A, C759T y A803G se encontraban en el mismo alelo y que el individuo era heterocigoto para esta combinación de polimorfismo y para el alelo NAT4\*12A.

#### 4.6 Frecuencia de los alelos variantes de NAT2 en la población estudiada.

Después de designarles los alelos correspondientes a cada individuo, se obtuvo la frecuencia alélica en la población de estudio. En la tabla XXIV se muestran todos los polimorfismos encontrados y su velocidad de acetilación que se les asignó de acuerdo a la nomenclatura existente.

**Tabla XXIV.** Frecuencia alélica individual y velocidad de acetilación en la población de estudio

N°	Polimorfismos											Alelo 1	Alelo 2	Tipo de Acetilador
	T111C	G191A	C282T	T341C	A434C	C481T	G590A	C759T	A803G	A845C	G857A			
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
2	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento
3	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
4	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
5	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
6	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
7	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
9	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
10	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento

N°	Polimorfismos											Alelo	Alelo	Tipo de
	T111C	G191A	C282T	T341C	A434C	C481T	G590A	C759T	A803G	A845C	G857A	1	2	Acetilador
11	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
12	N	N	H	H	N	H	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*12B	Intermedio
13	N	N	N	M	N	M	N	N	H	N	N	NAT2*5A	NAT2*5B	Lento
14	N	N	N	H	N	H	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*5A	Intermedio
15	N	N	H	N	N	N	N	N	H	N	H	NAT2*7B	NAT2*12A	Intermedio
16	N	N	H	H	N	H	H	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5C	Lento
17	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
18	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
19	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7A	Intermedio
21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
22	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
23	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
24	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
25	N	N	N	H	N	N	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5C	Intermedio
26	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
27	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
28	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
29	N	N	M	N	N	N	M	N	N	N	N	NAT2*6A	NAT2*6A	Lento
30	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
31	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
32	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
33	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento
34	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
35	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
36	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
37	N	N	H	H	N	N	N	N	H	N	N	NAT2*5C	NAT2*13	Intermedio
38	N	N	H	N	N	H	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*13B	Rápido
39	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*7B	NAT2*13	Intermedio
40	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
41	N	N	M	N	N	N	H	N	N	N	H	NAT2*6A	NAT2*7B	Lento
42	N	N	H	H	N	N	N	N	H	N	H	NAT2*5C	NAT2*7B	Lento
43	N	N	N	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6B	Lento
44	N	N	N	N	N	N	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*12A	Rápido
45	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
46	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
47	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
48	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
49	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
50	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
51	N	N	M	N	N	N	M	N	N	N	N	NAT2*6A	NAT2*6A	Lento
52	N	N	N	N	N	N	H	H	M	N	N		NAT2*12A	Intermedio
53	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
54	N	N	M	N	N	N	N	N	N	N	M	NAT2*7B	NAT2*7B	Lento
55	N	N	N	H	N	H	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*12A	Intermedio
56	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
57	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento

N°	Polimorfismos											Alelo	Alelo	Tipo de
	T111C	G191A	C282T	T341C	A434C	C481T	G590A	C759T	A803G	A845C	G857A	1	2	Acetilador
58	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
59	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
60	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento
61	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
62	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento
63	N	N	M	N	N	N	H	N	N	N	H	NAT2*6A	NAT2*7B	Lento
64	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
65	N	N	N	H	N	N	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5C	Intermedio
66	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
67	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
68	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*13	Rápido
69	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
70	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
71	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
72	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
73	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
74	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento
75	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
76	N	N	H	H	N	N	N	N	H	N	H	NAT2*5C	NAT2*7B	Lento
77	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
78	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
79	N	N	M	N	N	N	M	N	N	N	N	NAT2*6A	NAT2*6A	Lento
80	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
81	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento
82	N	N	N	N	N	N	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*12A	Rápido
83	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
84	N	N	H	H	N	H	N	N	H	N	H	NAT2*5B	NAT2*7B	Lento
85	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
86	N	N	M	N	N	N	M	N	N	N	N	NAT2*6A	NAT2*6A	Lento
87	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
88	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
89	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
90	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
91	N	N	H	N	N	N	H	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*6A	Intermedio
92	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	H	NAT2*4	NAT2*7B	Intermedio
93	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
94	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido
95	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
96	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
97	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
98	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
99	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
100	N	N	N	M	N	M	N	N	M	N	N	NAT2*5B	NAT2*5B	Lento
101	N	N	H	H	N	H	H	N	H	N	N	NAT2*5B	NAT2*6A	Lento
102	N	N	N	H	N	H	N	N	H	N	N	NAT2*4	NAT2*5B	Intermedio
103	N	N	N	N	N	N	N	N	M	N	N	NAT2*12A	NAT2*12A	Rápido
104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NAT2*4	NAT2*4	Rápido

En la tabla XXV se muestran los 14 alelos encontrados en la población de estudio y su frecuencia.

**Tabla XXV.** Frecuencia alélica en la población de estudio

Alelos	No	%	Alelos	No	%
NAT2*4	65	31.25	NAT2*7A	1	0.48
NAT2*5A	2	0.96	NAT2*7B	24	11.54
NAT2*5B	67	32.21	NAT2*12A	7	3.37
NAT2*5C	5	2.40	NAT2*12B	1	0.48
NAT2*6A	29	13.94	NAT2*13	3	1.44
NAT2*6B	1	0.48	NAT2*13B <sup>a</sup>	1	0.48
NAT2*6C	1	0.48	G590A/C759T/A803G	1	0.48

<sup>a</sup> Myron Gross *cols.*, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1999 8:683-692<sup>49</sup>

#### 4.7 Patrón de acetilación

El patrón de acetilación se determinó de acuerdo a dos modelos: En la tabla XXVI se muestran los resultados del modelo bimodal donde el 14% de la población de estudio son acetiladores rápidos y un 86% son acetiladores lentos. Con el modelo trimodal (tabla XXVII) los acetiladores rápidos quedan igual, pero los acetiladores lentos disminuyen a un 40% y surgen los acetiladores intermedios con un 46%.

**Tabla XXVI.** Modelo bimodal

Acetilador	%
Lento	85.6
Rápido	14.4

**Tabla XXVII.** Modelo trimodal

Acetilador	%
Lento	40.4
Intermedio	45.2
Rápido	14.4

## CAPITULO V

### DISCUSIÓN

En este trabajo se investigo el genotipo NAT2 en 104 voluntarios sanos de la población del noreste de México. Siendo uno de los primeros trabajos realizados en el noreste de México.

Inicialmente se detectaron los polimorfismos presentes en cada individuo por RFLPs. De los 11 polimorfismos estudiados solo se encontraron 8 en la población de estudio. En la tabla XXIII se puede observar que los polimorfismos mas frecuentes fueron A803G, T341C, C481T y C282T, teniendo una presencia del 50% o más en la población estudiada. Los polimorfismos G590A y G857A tuvieron una frecuencia del 28 y 24%, respectivamente. El polimorfismo C759T solamente se presentó una vez (1%) y fue en forma de heterocigoto. Con respecto a los polimorfismos T111C, G191A, A434C y A845C no se encontraron en la población de estudio.

Después de haber determinado los polimorfismos en cada individuo se realizo un análisis de ligamiento por RFLPs para asignar los alelos. La tabla XXV muestra la frecuencia de los 14 alelos encontrados en la población de estudio. Los alelos mas frecuentes fueron el alelo NAT2\*5B, que es un alelo de acetilación lenta y el alelo NAT2\*4, que es el alelo silvestre, al cual se le considera que es un alelo acetilador rápido. Otros alelos con una frecuencia moderada fueron los alelos NAT2\*6A y NAT2\*7B, ambos siendo alelos acetiladores lentos. Los alelos acetiladores lentos que se presentaron en menor frecuencia son NAT2\*5C, NAT2\*5A, NAT2\*6B, NAT2\*6C y NAT2\*7A. Además de alelo NAT2\*4, se presentaron en esta población otros alelos

acetiladores rápidos que fueron NAT2\*12A, NAT2\*13 y NAT2\*12B, que tuvieron una frecuencia de moderada a baja.

Al comparar la frecuencia alélica encontrada en este estudio con las frecuencias alélicas publicadas sobre hispanos y otros grupos étnicos (tabla II), se observan variaciones con respecto a nuestra población de estudio. Como se observa en la tabla II para la variaciones alélicas NAT2\*5A/B/C en los grupos indígenas se identificó una baja frecuencia de estos alelos (2% y 10%), y en grupo hispano se presenta una frecuencia relativamente alta (28%), mientras que en nuestro estudio se observa una frecuencia mayor (35.5%). En otro estudio realizado por Vargas y cols.<sup>98</sup> en una población colombiana, se encontró una frecuencia de 44.4%, la cual es similar a la reportada para los caucásicos (43% a 46%),<sup>99,100</sup> pero mayor a la observada en nuestra población. Para la variaciones alélicas NAT2\*6A/B/C se ha reportado una baja frecuencia para los indios americanos (0% y 3.5%)<sup>101,102</sup> y en una población colombiana (3.9%).<sup>98</sup> En cambio, la tabla II muestra que para el grupo de hispanos la frecuencia es de un 18%, la cual es similar a la que encontramos en este estudio de un 14.9%. Esta frecuencia es menor a la reportada para grupos caucásicos (26% a 31%) y Asiáticos (22% a 36%). En la tabla II ambos grupos indígenas presentan una mayor frecuencia de las variaciones alélicas NAT2\*7A/B (24% y 21%), mientras que en el grupo caucásico se presenta en 1 a 2 %, en el grupo asiático su frecuencia es de un 10% a 18% y en los aborígenes de Australia hasta un 40%. Sin embargo en los hispanos podemos ver que la frecuencia es de un 14%, similar a la encontrada por nosotros de un 12%, aunque en algunas poblaciones hispanas como la colombiana<sup>98</sup> se halló una frecuencia de 36.7%. Las variaciones alélicas NAT2\*14A/B que se muestran en la tabla II tienen una frecuencia similar (0% a 1%) a las encontradas en nuestro estudio (0%), a excepción de los grupos

Afroamericanos y Africanos, donde la frecuencia es mayor (8% y 9%); por lo cual, estos alelos se consideran exclusivos de la raza negra.

En un estudio<sup>98</sup> donde evaluaron 137 individuos para determinar la actividad fenotípica de la N-Acetiltransferasa en hispanos, mediante la medición de los metabolitos urinarios de la cafeína, se encontraron un 29.9% de acetiladores lentos, un 56.93% de acetiladores intermedios y un 13.13% de acetiladores rápidos. El resultado que se aproxima es el de los acetiladores rápidos con un 14.4%, los acetiladores lentos (40.4%) es mayor con un 10.1% y los acetiladores intermedios (45.2%) es menor con un 10.93%.

Se encontró un alelo que no está reportado en la nomenclatura de NAT2, pero que ya se encuentra reportado por Myron Gross y cols.<sup>50</sup>, proponiendo el nombre de NAT2\*13B. Al igual que en ese estudio la presencia de este alelo fue muy baja de 0.48%. Otro alelo que no se encuentra reportado se encontró en este estudio, el cual se compone de la siguiente combinación de polimorfismos: G590A, C759T y A803G. Este alelo podría ser un genotipo acetilador lento debido a que posee el polimorfismo G590A, el cual en estudios *in vitro* e *in vivo* se comporta como un fenotipo acetilador lento, sin embargo habrá que demostrarlo en un estudio farmacológico.

Por último cabe decir que existen diferencias entre los grupos étnicos y también entre los individuos de cada grupo étnico, por lo tanto el comportamiento frente a medicamentos, agentes carcinogénicos y otros metabolitos que sean acetilados por esta enzima, va a ser diferente entre grupos étnicos y entre diferentes individuos dentro estos grupos.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES

El genotipo acetilador más común fue el intermedio con un 46%, seguido por el lento con un 40% y finalmente el genotipo acetilador rápido con un 14%.

Los alelos mas frecuentes en nuestra población de estudio fueron el alelo NAT2\*5B, el cual es un alelo con un genotipo acetilador lento y el alelo NAT2\*4, que es el alelo silvestre y que tiene un genotipo acetilador rápido.

Nuestros datos sobre el genotipo varían a los reportados para las poblaciones hispanas en los alelos NAT2\*4, el cual se encuentra en menor frecuencia y el alelo NAT2\*5 que su frecuencia es mayor a la reportada. Mientras que los alelos NAT2\*6 y NAT2\*7 sus frecuencias son ligeramente menores a las reportada.

Se encontró una combinación de polimorfismos que no está reportada (G590A, C759T y A803G).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO VII

## BIBLIOGRAFÍA

1. Miller, M.C., Mohrenweiser, H.W. y Bell, D.A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*. 120: 269-280. (2001).
2. Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N. y Vermeulen, N.P. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 29: 59-124. (1999).
3. Zacest, R. y Koch-Weser, J. Relation of hydralazine plasma concentration to dosage and hypotensive action. *Clin. Pharmacol. Ther.* 13: 420-425. (1972).
4. Forstrom, L., Mattila, M.J. y Mustakallio, K.K. Acetylator phenotype, minimal maintenance dose and haemolytic effect of dapsone in dermatitis herpetiformis. *Ann. Clin. Res.* 6: 308-310. (1974).
5. Jounela, A.J., Pasanen, M. y Mattila, M.J. Acetylator phenotype and the antihypertensive response to hydralazine. *Acta Med. Scand.* 197: 303-306. (1975).
6. Ramsay, L.E., Silas, J.H., Ollerenshaw, J.D., Tucker, G.T., Phillips, F.C. y Freestone, S. Should the acetylator phenotype be determined when prescribing hydralazine for hypertension?. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26: 39-42. (1984).
7. Nebert, D.W. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist?. *Am. J. Hum. Genet.* 60(2): 265-71. (1997).
8. Evans W.E. y Relling M.V. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 286: 487-491. (1999).
9. Gonzalez, F.J., Skodak, R.C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U.M., Nebert, D.W., Gelboin, H.V., Hardwick, J.P. y Meyer, U.A. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*. 331: 442-445. (1988).
10. Mahgoub, A., Idle, J.R., Dring, L.G., Lancaster, R. y Smith, R.L. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*. 2: 584-586. (1977).
11. Krynetski, E.Y. y Evans, W.E. Pharmacogenetics of Cancer Therapy: Getting Personal. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 11-16. (1998).

12. Nakamura, H., Uetrecht, J., Cribb, A.E., Miller, M.A., Zahid, N., Hill, J., Josephy, P.D., Grant, D.M. y Spielberg, S.P. *In vitro* formation, disposition and toxicity of N-acetoxy-sulfamethoxazole, a potential mediator of sulfamethoxazole toxicity. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 274: 1099-1104. (1995).
13. Blum, M., Demierre, A., Grant, D.M., Heim, M. y Meyer, U.A. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5237-5241. (1991).
14. Alu, W.W., Sierra-Torres, C.H., Cajas-Salazar, N. y Salama, A.S. Inheritance of polymorphic metabolizing genes on environmental disease and quality of life. *Mutation Research.* 428: 131-140. (1999).
15. Ichiba, M., Hagma, L., Rannug, A., Hogstedt, B. Alexandrie, A.K., Carstensen, U. y Hemminki K. Aromatic DNA adducts, micronuclei and genetic polymorphism for CYP1A1 and GSTT1 in chimney sweeps. *Carcinogenesis.* 15: 1347-1352. (1994).
16. Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hirvonen, A. y Pelkonen, O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility: a review. *Gene.* 159: 113-121. (1995).
17. Tampier L. Programa de farmacología molecular y clínica: Biotransformación de fármaco. <http://www.geocities.com/Paris/Jardin/3845/biotransformación.html>.
18. Kadlubar, F.F., Butler, M.A., Kaderlik, K.R., Chou, H-C. y Lang, N. P. Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 98: 69-74, 1992.
19. Ayesh, R. y Smith, R. L. Genetic polymorphism in human toxicology. In: P. Turner and G. N. Volans (eds.), *Recent Advances in Clinical Pharmacology and Toxicology.* pp. 137-157. Edinburgh: Churchill Livingstone. (1989).
20. Hein, D.W. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 948: 37-66. (1988).
21. Hein, D.W., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K., Feng, Y., Ferguson, R.J. y Grant, D.M. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis.* 14: 1633-1638. (1993).
22. Kato, R. Metabolic activation of mutagenic heterocyclic aromatic amines from protein pyrolysates. *Crit Rev Toxicol.* 16: 307-348. (1986).

23. Minchin, R.F., Reeves, P.T., Teitel, C.H., McManus, M.E., Mojarrabi, B., Ilett, K.F. *et al.* N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 185: 839–844. (1992).
24. Zenser, T.V., Lakshmi, V.M., Rustan, T.D., Doll, M.A., Deitz, A.C., Davis, B.B. *et al.* Human N-acetylation of benzidine: role of NAT1 and NAT2. *Cancer Res.* 56: 3941–3947. (1996).
25. Deguchi, T., Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine N-acetyltransferase of human liver. *J. Biol. Chem.* 267: 18140-18147. (1992).
26. Hickman, D., Risch, A., Camilleri, J.P. y Sim, E. Genotyping human polymorphic arylamine N-acetyltransferase: identification of new slow allotypic variants. *Pharmacogenetics.* 2: 217-226. (1992).
27. Bell, D.A., Taylor, J.A., Butler, M.A., Stephens, E.A., Wiest, J., Brubaker, L.H., Kadlubar, F.F. y Lucier, G.W. Genotype:phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis.* 14: 1689–1692. (1993a).
28. Ohsako, S. y Deguchi, T. Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver. *J. Biol. Chem.* 265: 4630–4634. (1990).
29. Butcher, N.J., Boukouvala, S., Sim, E. y Minchin, R.F. Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *The Pharmacogenomics Journal.* 2: 30–42. (2002).
30. Weber, W.W. y Vatsis, K.P. Individual variability in *p*-aminobenzoic acid N-acetylation by human N-acetyltransferase (NAT1) of peripheral blood. *Pharmacogenetics* 3, 209–212. (1993).
31. Le Marchand, L., Sivaraman, L., Franke, A.A., Custer, L.J., Wilkens, L.R., Lau, A.F. y Cooney, R.V. Predictors of N-acetyltransferase activity: should caffeine phenotyping and NAT2 genotyping be used interchangeably in epidemiological studies?. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5: 449–455. (1996).
32. Sinha, R. y Caporaso, N. Heterocyclic amines, cytochrome P450 1A2 and N-acetyltransferase: issues involved in incorporating putative genetic susceptibility markers into epidemiological studies. *Ann. Epidemiol.* 7: 350–356. (1997).
33. Sinclair, J.C., Sandy, J., Delgoda, R., Sim, E. y Noble, M.E. Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nat. Struct. Biol.* 7: 560–564. (2000).

34. Andres, H.H., Klem, A.J., Schopfer, L.M., Harrison, J.K. y Weber, W.W. On the active site of liver acetyl-CoA. Arylamine N-acetyltransferase from rapid acetylator rabbits (III/J). *J. Biol. Chem.* 263: 7521–7527. (1988).
35. Dupret, J.M. y Grant, D.M. Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine N-acetyltransferase expressed in *Escherichia coli*. Evidence for direct involvement of Cys68 in the catalytic mechanism of polymorphic human NAT2. *J. Biol. Chem.* 267: 7381–7385. (1992).
36. Yamamura, E., Sayama, M., Kakikawa, M., Mori, M., Taketo, A. y Kodaira, K. Purification and biochemical properties of an N-hydroxyarylamine Oacetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1475: 10–16. (2000).
37. Kattner, E., Dubbels, R. y Schloot, W. Acetylation of procainamide and isoniazid by a rat liver-N-acetyl-transferase. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 6: 81–84. (1981).
38. Riddle, B. y Jencks, W.P. Acetyl-coenzyme A: arylamine N-acetyltransferase. Role of the acetyl-enzyme intermediate and the effects of substituents on the rate. *J. Biol. Chem.* 246: 3250–3258. (1971).
39. Blum, M., Grant, D.M., McBride, W., Heim, M. y Meyer, U.A. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA & Cell Biol.* 9: 193–203. (1990).
40. Grant, D.M., Blum, M., Demierre, A. y Meyer, U.A. Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucl. Acids. Res.* 17: 3978. (1989).
41. Matas, N., Thygesen, P., Stacey, M., Risch, A. y Sim, E. Mapping AAC1, AAC2 and AACP, the genes for arylamine N-acetyltransferases, carcinogen metabolising enzymes on human chromosome 8p22, a region frequently deleted in tumours. *Cytogenet Cell Genet.* 77: 290–295. (1997).
42. Bova, G.S., Carter, B.S., Bussemakers, M.J., Emi, M., Fujiwara, Y., Kyprianou, N. *et al.* Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.* 53: 3869–3873. (1993).
43. Maitra, A., Tavassoli, F.A., Albores-Saavedra, J., Behrens, C., Wistuba, I.I., Bryant, D. *et al.* Molecular abnormalities associated with secretory carcinomas of the breast. *Hum. Pathol.* 30: 1435–1440. (1999).
44. Lutchman, M., Pack, S., Kim, A.C., Azim, A., Emmert-Buck, M., van Huffel, C. *et al.* Loss of heterozygosity on 8p in prostate cancer implicates a role for dematin in tumor progression. *Cancer Genet Cytogenet.* 115: 65–69. (1999).

45. Brown, M.R., Chuaqui, R., Vocke, C.D., Berchuck, A., Middleton, L.P., Emmert-Buck, M.R. *et al.* Allelic loss on chromosome arm 8p: analysis of sporadic epithelial ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* 74: 98–102. (1999).
46. Wistuba, I.I., Behrens, C., Virmani, A.K., Milchgrub, S., Syed, S., Lam, S. *et al.* Allelic losses at chromosome 8p21–23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res.* 59: 1973–1979. (1999).
47. Vincent-Viry, M., Pontes, Z. B., Gueguen, R., Galteau, M-M. y Siest, G. Segregation analyses of four urinary caffeine metabolic ratios implicated in the determination of human acetylation phenotypes. *Genet. Epidemiol.* 11: 115–129. (1994).
48. Butler, M. A., Lang, N. P., Young, J. F., Caporaso, N. E., Vineis, P., Hayes, R. B., Teitel, C. H., Massengill, J. P., Lawsen, M. F. y Kadlubar, F. F. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics.* 2: 116–127, 1992.
49. Hein, D.W., Grant, D.M. y Sim, E. Update on consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenetics.* 10: 291–292. (2000).
50. Gross, M., Kruisselbrink, T., Anderson, K., Lang, N., McGovern, P., Delongchamp, R. y Kadlubar, F. Distribution and Concordance of N-Acetyltransferase Genotype and Phenotype in an American Population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 8: 683–692. (1999).
51. Hein, D.W., Ferguson, R.J., Doll, M.A., Rustan, T.D. y Gray, K. Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type, mutant, and chimeric NAT2 allozymes. *Hum. Mol. Genet.* 3: 729–734. (1994).
52. Grant, D.M., Blum, M., Beer, M. y Meyer, U.A. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol. Pharmacol.* 39: 184–191. (1991).
53. Vatsis, K.P., Weber, W.W., Bell, D.A., Dupret, J.M., Evans, D.A., Grant, D.M. *et al.* Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics.* 5: 1–17. (1995).
54. Grant, D.M., Hughes, N.C., Janezic, S.A., Goodfellow, G.H., Chen, H.J., Gaedigk, A. *et al.* Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat. Res.* 376: 61–70. (1997).
55. Hein, D.W., Doll, M.A., Fretland, A.J., Leff, M.A., Webb, S.J., Xiao, G.H. *et al.* Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention.* 9: 29–42. (2000).

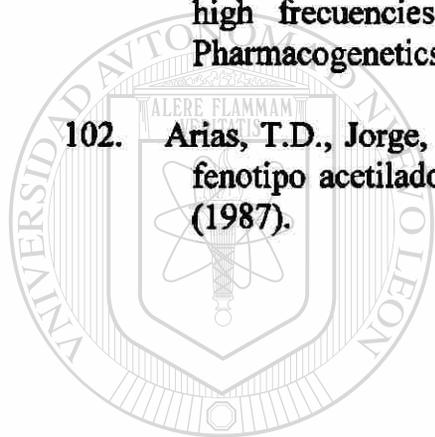
56. Grant, D.M., Morike, K., Eichelbaum, M. y Meyer, U.A. Acetylation pharmacogenetics. The slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J. Clin. Invest.* 85: 968–972. (1990).
57. Hein, D.W., Doll, M.A., Rustan, T.D., Ferguson, R.J. Metabolic activation of N-hydroxyarylamines and N-hydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer Res.* 55: 3531–3536. (1995).
58. Delomenie, C., Goodfellow, G.H., Krishnamoorthy, R., Grant, D.M. y Dupret J.M. Study of the role of the highly conserved residues Arg<sup>9</sup> and Arg<sup>64</sup> in the catalytic function of human N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 323: 207–215. (1997).
59. Leff, M.A., Fretland, A.J., Doll, M.A. y Hein, D.W. Novel human N-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype. *J. Biol. Chem.* 274: 34519–34522. (1999).
60. Evans, D.A. N-acetyltransferase. *Pharmacol Therapeut.* 42: 157–234. (1989).
61. Lin, H.J. Smokers and breast cancer. ‘Chemical individuality’ and cancer predisposition. *J. Am. Med. Assoc.* 276:1511–1512. (1996).
62. Meyer, U.A. y Zanger, U.M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37: 269–296. (1997).
63. Bonicke, R. y Reif, W. Enzymatische inaktivierung von isonicotinsaurehydrazid im menschlichen und tierischen organismus. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 220: 321–333. (1953).
64. Spielberg, S.P. N-acetyltransferases: pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. *J. Pharmacokinet Biopharmaceut.* 24: 509–519. (1996).
65. Das, K.M. y Dubin, R. Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine. *Clin Pharmacokinet.* 1: 406–425. (1976).
66. Shear, N.H., Spielberg, S.P., Grant, D.M., Tang, B.K. y Kalow, W. Differences in metabolism of sulfonamides predisposing to idiosyncratic toxicity. *Ann. Intern. Med.* 105: 179–184. (1986).
67. Cribb, A.E., Nuss, C.E., Alberts, D.W., Lamphere, D.B., Grant, D.M., Grossman, S.J. *et al.* Covalent binding of sulfamethoxazole reactive metabolites to human and rat liver subcellular fractions assessed by immunochemical detection. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 500–507. (1996).

68. May, D.G., Porter, J.A., Uetrecht, J.P., Wilkinson, G.R. y Branch, R.A. The contribution of N-hydroxylation and acetylation to dapsone pharmacokinetics in normal subjects. *Clin. Pharmacol Therapeut.* 48: 619–627. (1990).
69. Bluhm, R.E., Adedoyin, A., McCarver, D.G. y Branch, R.A. Development of dapsone toxicity in patients with inflammatory dermatoses: activity of acetylation and hydroxylation of dapsone as risk factors. *Clin. Pharmacol Therapeut.* 65: 598–605. (1999).
70. Ratain, M.J., Mick, R., Berezin, F., Janisch, L., Schilsky, R.L., Williams, S.F. *et al.* Paradoxical relationship between acetylator phenotype and amonafide toxicity. *Clin. Pharmacol Therapeut.* 50: 573–579. (1991).
71. Ratain, M.J., Mick, R., Berezin, F., Janisch, L., Schilsky, R.L., Vogelzang, N.J. *et al.* Phase I study of amonafide dosing based on acetylator phenotype. *Cancer Res.* 53: 2304–2308. (1993).
72. Ratain, M.J., Rosner, G., Allen, S.L., Costanza, M., Van Echo, D.A., Henderson, I.C. *et al.* Population pharmacodynamic study of amonafide: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 13: 741–747. (1995).
73. Ratain, M.J., Mick, R., Janisch, L., Berezin, F., Schilsky, R.L., Vogelzang, N.J. *et al.* Individualized dosing of amonafide based on a pharmacodynamic model incorporating acetylator phenotype and gender. *Pharmacogenetics.* 6: 93–101. (1996).
74. Payton, M., Auty, R., Delgoda, R., Everett, M. y Sim, E. Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. *J. Bacteriol.* 181: 1343–1347. (1999).
75. Delomenie, C., Fouix, S., Longuemaux, S., Brahimi, N., Bizet, C., Picard, B. *et al.* Identification and functional characterisation of arylamine N-acetyltransferase in eubacteria: evidence for highly selective acetylation of 5-aminosalicylic acid. *J. Bacteriol.* 183: 3417–3427. (2001).
76. Okumura, F., Ueda, O., Kitamura, S. y Tatsumi, K.. N-acetylation and Nformylation of carcinogenic arylamines and related compounds in dogs. *Carcinogenesis.* 16: 71–76. (1995).
77. Trepanier, L.A., Ray, K., Winand, N.J., Spielberg, S.P. y Cribb, A.E. Cytosolic arylamine N-acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to an absence of NAT genes. *Biochem. Pharmacol.* 54: 73–80. (1997).

78. Moller, L., Zeisig, M., Midtvedt, T. y Gustafsson, J.A. Intestinal microflora enhances formation of DNA adducts following administration of 2-NF and 2-AAF [published erratum appears in *Carcinogenesis*. 15(12): 2969 (1994)]. *Carcinogenesis*. 15: 857–861. (1994).
79. Besarati Nia, A., Van Straaten, H.W., Kleinjans, J.C. y Van Schooten, F.J. Immunoperoxidase detection of 4-aminobiphenyl- and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adducts in induced sputum of smokers and nonsmokers. *Mutat. Res.* 468: 125–135. (2000).
80. Nagao, M., Wakabayashi, K., Ushijima, T., Toyota, M., Totsuka, Y. y Sugimura, T. Human exposure to carcinogenic heterocyclic amines and their mutational fingerprints in experimental animals. *Environ Health Perspect.* 104: 497–501. (1996).
81. Smith, C.J., Livingston, S.D. y Doolittle, D.J. An international literature survey of 'IARC Group I carcinogens' reported in mainstream cigarette smoke. *Food & Chem. Toxicol.* 35: 1107–1130. (1997).
82. Sram, R.J. y Binkova, B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997–1999. *Environ Health Perspect.* 108: 57–70. (2000).
83. Mao, Y., Hu, J., Ugnat, A.M. y White K. Non-Hodgkin's lymphoma and occupational exposure to chemicals in Canada. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Ann. Oncol.* 11: 69–73. (2000).
84. Zhou, Q., Talaska, G., Jaeger, M., Bhatnagar, V.K., Hayes, R.B., Zenzer, T.V. *et al.* Benidine-DNA adduct levels in human peripheral white blood cells significantly correlate with levels in exfoliated urothelial cells. *Mutat. Res.* 393: 199–205. (1997).
85. Lower, G.M., Jr, Nilsson, T., Nelson, C.E., Wolf, H., Gamsky, T.E. y Bryan, G.T. N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environ Health Perspect.* 29: 71–79. (1979).
86. Wohlleb, J.C., Hunter, C.F., Blass, B., Kadlubar, F.F., Chu, D.Z. y Lang, N.P. Aromatic amine acetyltransferase as a marker for colorectal cancer: environmental and demographic associations. *Int. J. Cancer.* 46: 22–30. (1990).
87. Ilett, K.F., David, B.M., Detchon, P., Castleden, W.M. y Kwa, R. Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 47: 1466–1469. (1987).
88. Lang, N.P., Chu, D.Z., Hunter, C.F., Kendall, D.C., Flammang, T.J. y Kadlubar, F.F. Role of aromatic amine acetyltransferase in human colorectal cancer. *Arch. Surg.* 121: 1259–1261. (1986).

89. Brockton, N., Little, J., Sharp, L. y Cotton, S.C. N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151: 846–861. (2000).
90. Chen, J., Stampfer, M.J., Hough, H.L., Garcia-Closas, M., Willett, W.C., Hennekens, C.H. *et al.* A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 3307–3311. (1998).
91. Welfare, M.R., Cooper, J., Bassendine, M.F. y Daly, A.K. Relationship between acetylator status, smoking, and diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis.* 18: 1351–1354. (1997).
92. Butcher, N.J., Ilett, K.F. y Minchin, R.F. Substrate-dependent regulation of human arylamine N-acetyltransferase-1 in cultured cells. *Mol. Pharmacol.* 57: 468–473. (2000).
93. Lang, N.P., Butler, M.A., Massengill, J., Lawson, M., Stotts, R.C., Hauer-Jensen, M. *et al.* Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention.* 3: 675–682. (1994).
94. Longuemaux, S., Delomenie, C., Gallou, C., Mejean, A., Vincent-Viry, M.N., Bouvier, R., Droz, D., Krishnamoorthy, R., Galteau, M.M., Junien, C., Beroud, C., y Dupret, J. M. Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobioticmetabolizing enzymes. *Cancer Res.* 59: 2903–2908. (1999).
95. Deitz, A.C., Zheng, W., Leff, M.A., Gross, M., Wen, W-Q., Doll, M.A., Xiao, G.H., Folsom, A.R. y Hein, D.W. N-Acetyltransferase-2 Genetic Polymorphism, Well-done Meat Intake, and Breast Cancer Risk among Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 9: 905–910. (2000).
96. Nyberg, F., Hou, S-M., Hemminki, K., Lambert, B., y Pershagen, G. Glutathione S-transferase M1 and N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and exposure to tobacco smoke in nonsmoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 7: 875–883. (1998).
97. Ausubel F.M, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A, y Struhl, K. Short protocols in molecular biology. Four edition. (1999).

98. Vargas-Franco, J.W., Camargo, M. y Cuesta de F., F. Farmacogenética: caracterización del polimorfismo NAT-2 en una población colombiana. <http://www.colciencias.gov.co/seiaal/congreso/ponen5/VARGAS.htm>.
99. Lin, H.J., Chun-Ya, H., Lin, B.K. y Hardy, S. Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics*. 4: 125-134. (1995).
100. Lin, H.J. y Chun-Ya, H. Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, Blacks, Hispanics and Whites: applications to metabolic epidemiology. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 827-834. (1993).
101. Arias, T.D., Jorge, L.F., Griese, E-U. y Inaba, TEM. Polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) in Amerindian populations of Panama and Colombia: high frecuencies fo point mutations 857A, as found in allele S3/M3. *Pharmacogenetics*. 3: 328-331. (1993).
102. Arias, T.D., Jorge, L.F., Núñez, G. y Tadanobu, I. Estudio Preliminar sobre el fenotipo acetilador de los amerindios Teribes. *Rev. Med. Panamá*. 12: 30-36 (1987).

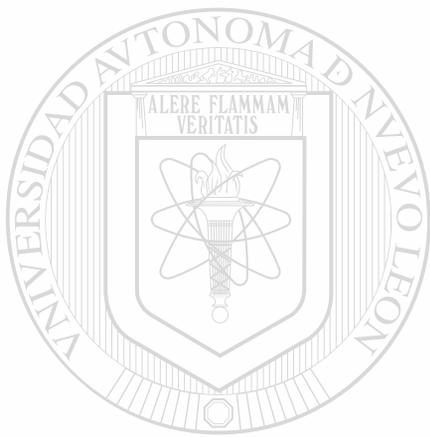


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



