

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

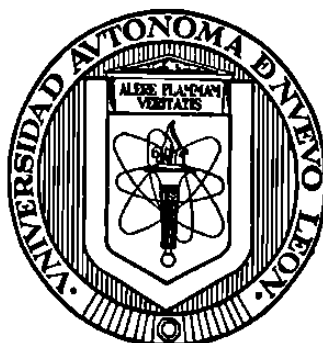
TM
QH455
.P4
2005
c.1



1080127618

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**

**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

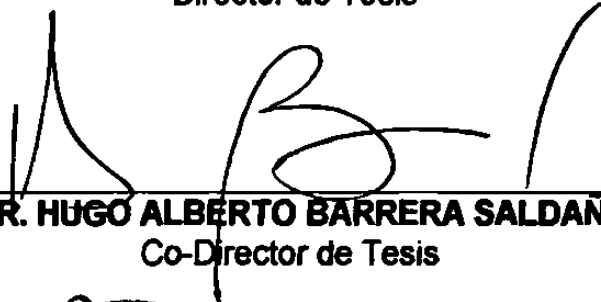


**CARACTERIZACIÓN DEL GENOTIPO N-ACETILTRANSFERASA 2
(NAT2) EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE
MÉXICO**

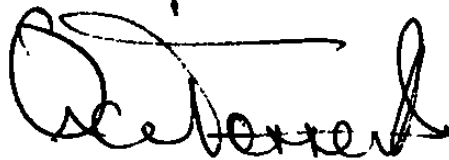
Aprobación de la Tesis:



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.

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.

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).

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Página
TABLA DE CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
NOMENCLATURA	xii
RESUMEN	xiv
CAPITULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
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
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	26
2.1 Justificación	26
2.2 Objetivo general	27
2.3 Objetivos específicos	27

3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
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
4. RESULTADOS	53
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
5. DISCUSIÓN	84
6. CONCLUSIONES	87
7. BIBLIOGRAFÍA	88

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 25. 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
Figura 26. 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
Figura 27. Digestión con la enzima <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Kpn</i> I (C481T)	72
Figura 28. 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
Figura 29. 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
Figura 30. Digestión con la enzima <i>Kpn</i> I (C481T) y <i>Taq</i> I (G590A)	74
Figura 31. 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
Figura 32. 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
Figura 33. Digestión con las enzimas <i>Dde</i> I (A803G) y <i>Hinf</i> I (G857A)	77
Figura 34. 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
Figura 39. Digestión con la enzima <i>Fok</i> I (C282T) y <i>Kpn</i> I (C481T)	79

LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	Página
Tabla I. Alelos humanos NAT2	14
Tabla II. Comparación Interétnica del alelo NAT2	19
Tabla III. Efecto del fenotipo acetilador sobre la respuesta y toxicidad de los fármacos	20
Tabla IV. Iniciadores para amplificar los fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb	34
Tabla V. Condiciones de amplificación para los fragmentos de 866 pb, 578 pb, 141 pb y 119 pb	35
Tabla VI. Programa para la amplificación del fragmento de 866 pb	36
Tabla VII. Programa para la amplificación del fragmento de 578 pb	36
Tabla VIII. Programa para la amplificación de los fragmentos de 141 pb y 119 pb	37
Tabla IX. Enzimas de restricción que digieren el producto amplificado de 886 pb, donde se muestran los fragmentos esperados de los alelos normales y mutados para cada polimorfismo	38
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	39
Tabla XI. 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
Tabla XII. Reacción de digestión de la diferentes enzimas de restricción	40
Tabla XIII. Reacción de digestión de las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Msp</i> A1 I	42
Tabla XIV. Fragmentos esperados de los alelos NAT2*5B y NAT2*4	42
Tabla XV. Reacción de digestión de las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Fok</i> I	45
Tabla XVI. Fragmentos esperados de los polimorfismos C481T y C282T	45
Tabla VII. Reacción de digestión de las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Taq</i> I	46

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

NOMENCLATURA

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	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
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
RNAm	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

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*^α, 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 esto, 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.¹

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.² 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).¹

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).²⁻⁶

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.⁷

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 sulfametodium, 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.⁸

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).⁹

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.¹⁰ 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,¹¹ 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.^{12,13} 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.⁸

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.⁸

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.¹

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.¹

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.¹⁴ 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.¹⁵

1.5 Clasificación de enzimas por su mecanismo de acción

Existen diversas enzimas metabolizadoras de fármacos muy bien conocidas que catalizan la activación y detoxificación de xenobióticos¹⁶ 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).

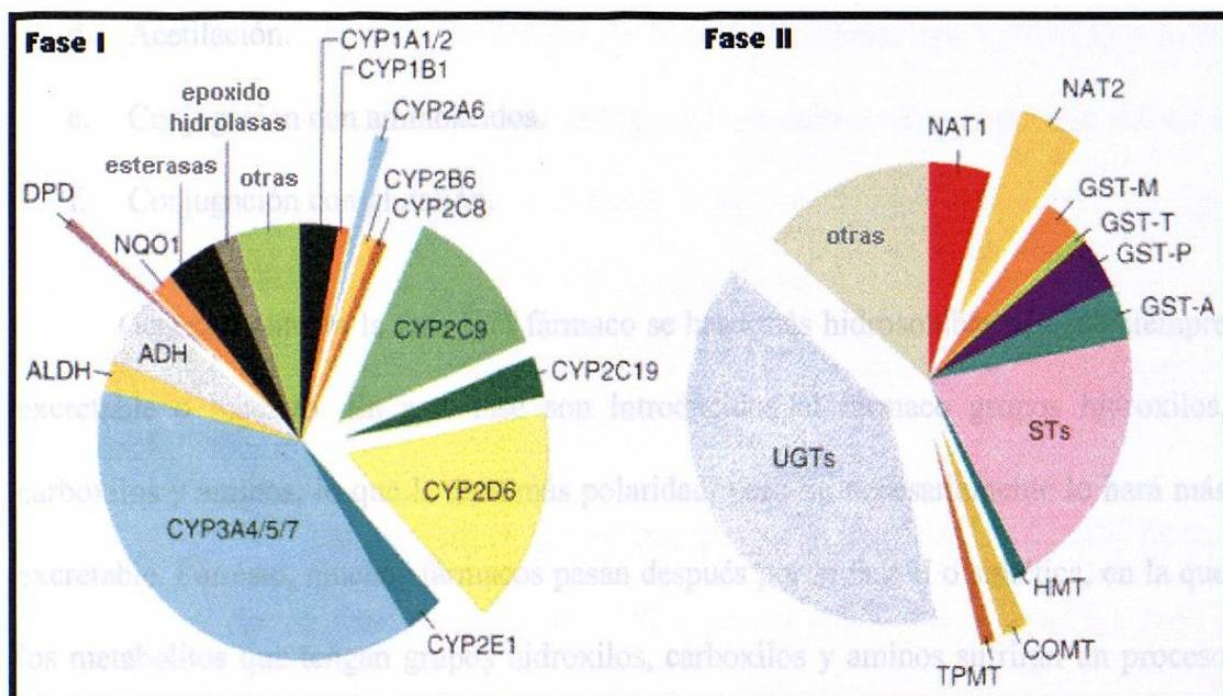


Figura 1. Enzimas de las Fases I y II. Las enzimas de la fase I transforman a los fármacos mediante la introducción de grupos funcionales, mientras que las enzimas de la fase II conjugan al fármaco con una sustancia endógena. Todas estas enzimas tienen polimorfismos asociados con cambios en el metabolismo 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.⁸

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.¹⁷

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.¹⁹ 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.^{19,20}

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.²¹⁻²⁴ 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.^{13,25-27}

Ohsako and Deguchi aislaron el transcrito para cada gen (NAT1 y NAT2) de una librería de DNAc de hígado humano en 1990.²⁸ La secuenciación de NAT1 y NAT2 reveló un número de alelos variantes que afectan la actividad de ambos genes in vivo.²⁹ Estos alelos pueden causar variación en la capacidad individual para la N-Acetilación, afectando así la susceptibilidad individual a toxinas ambientales.^{13,25-27}

Variaciones en los niveles de actividad de NAT1³⁰ y el fenotipo acetilador rápido y lento de NAT2 han sido reportadas.^{13,25-27} 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.^{31,32}

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.³³ Estudios de inhibición³⁴ y mutagénesis sitio dirigidas³⁵ 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.³³ 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 β -plegadas. El último dominio está en la región carboxilo terminal, es una combinación de β -plegadas y α -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.²⁹

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.^{36,37} 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.³⁸

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.²³

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.³⁹ Un pseudogen relacionado, NATP1, también ha sido identificado,³⁹ 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.⁴⁰ 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.^{39,41} Los genes están localizados en el brazo corto del cromosoma 8, más específicamente en la región 8p22,²⁶ la cual está comúnmente deletada en humanos con cáncer.⁴²⁻⁴⁶ NAT1 y NAT2 se expresan de una manera codominante autosómica.^{39,47,48} 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 D8S21⁴¹ (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.⁴⁹ El locus NAT2 tiene alelos que contienen desde una hasta cuatro SNPs.⁵⁰

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

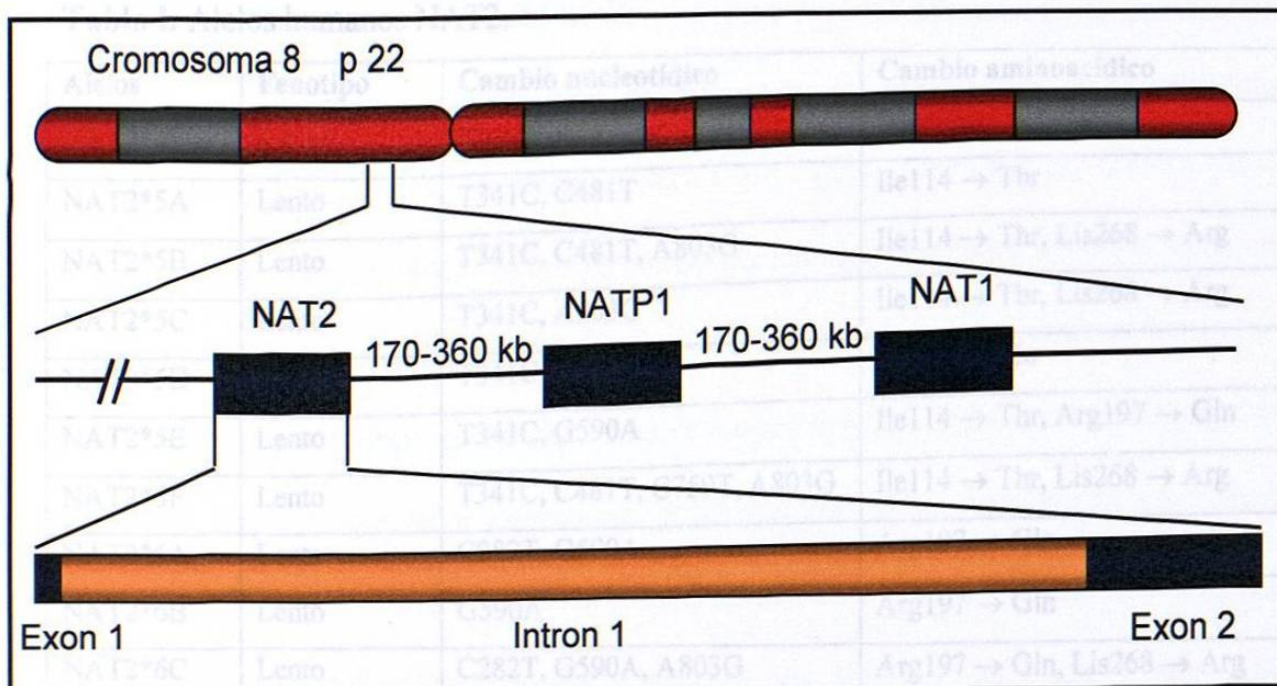


Figura 2. Localización del gen NAT2. Los loci NAT están separados por solo 170-360 kb y en una orientación NAT1→NATP1→NAT2 del centrómero al extremo del cromosoma. NAT2 es derivado de un exón (exón 2) que codifica la proteína junto con otro exón (exón 1) de 100 pb localizado a unos 8 kb río arriba del 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,^{13,52} 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).^{49,53,54}

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.

Alelos	Fenotipo	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico
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.^{26,27} 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.⁵⁵

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.⁵⁶ Hein y colaboradores⁵⁷ 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.^{51,54,58} 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 cols⁵⁶ 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.

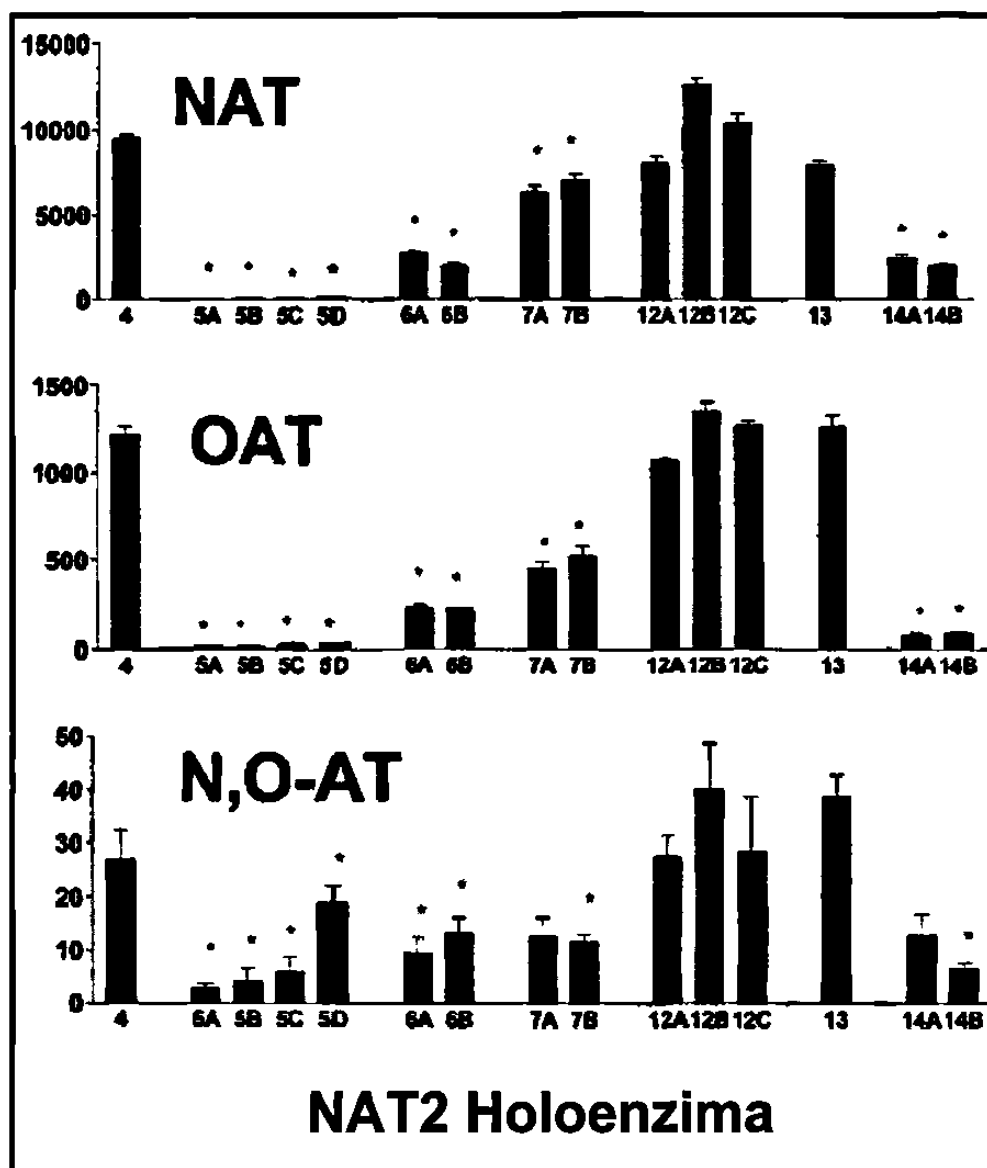


Figura 3. Actividad catalítica de NAT2. Capacidad relativa de las holoenzimas recombinantes N-acetiltransferasas humanas para catalizar la N-acetilación de 2-aminofluoreno (arriba), la O-acetilación de N-hidroxy-2-aminofluoreno (centro) y la N,O-acetilación de N-hidroxi-N-acetil-2-aminofluoreno (abajo). 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.⁵⁵

En un estudio realizado por Leff y cols.⁵⁹ 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,⁶⁰ 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.^{27,61} 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).⁶²

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.⁵⁰ 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.⁶³ 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.⁵ 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 mas 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 Rápido	Lupus eritematoso sistémico Decremento en el efecto terapéutico
Isoniazida	Lento Lento	Neuropatía Hepatotoxicidad
Cotrimoxazol	Lento	Varias reacciones adversas
Sulfasalazina	Lento Lento Lento	Variada toxicidad Hepatotoxicidad 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.⁶⁴ 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.⁶⁵⁻⁶⁷ 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.⁶⁴

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.⁶⁸ 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.⁶⁹

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/ μ l) comparado con las acetiladores lentos (células blancas = 3,400/ μ l) después de una dosis

estándar de 300 mg/m² diariamente por 5 días.⁷⁰⁻⁷² Debido a esto se han recomendado diferentes dosis para los dos grupos.^{71,73}

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.^{74,75} 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.⁷⁴ 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.⁷⁶ 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.⁷⁷ 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.⁷⁸ 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.⁷⁵

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.²⁹ 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 β -naftilamina presentes en el humo del tabaco.⁷⁹⁻⁸² Además de la exposición ocupacional a arilaminas carcinógenas como la benzidina, lo que también ha sido reportado.^{83,84}

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.⁸⁵ 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,⁸⁶⁻⁸⁸ mientras que otros han sido incapaces de confirmar esta predisposición.⁸⁹⁻⁹¹ 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 substrato dependiente.⁹² 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).^{90,91,93}

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

Diversos estudios han investigado la asociación entre el fenotipo o genotipo acetilador NAT2 y el cáncer de mama, pero los hallazgos han sido inconsistentes.⁵⁵ 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.⁹⁵ 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).^{55,96} 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.⁵⁵

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.⁵⁵

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.²⁹

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.

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.

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).⁹⁷
3. Amplificar cada muestra por PCR, usando cuatro juegos de iniciadores.

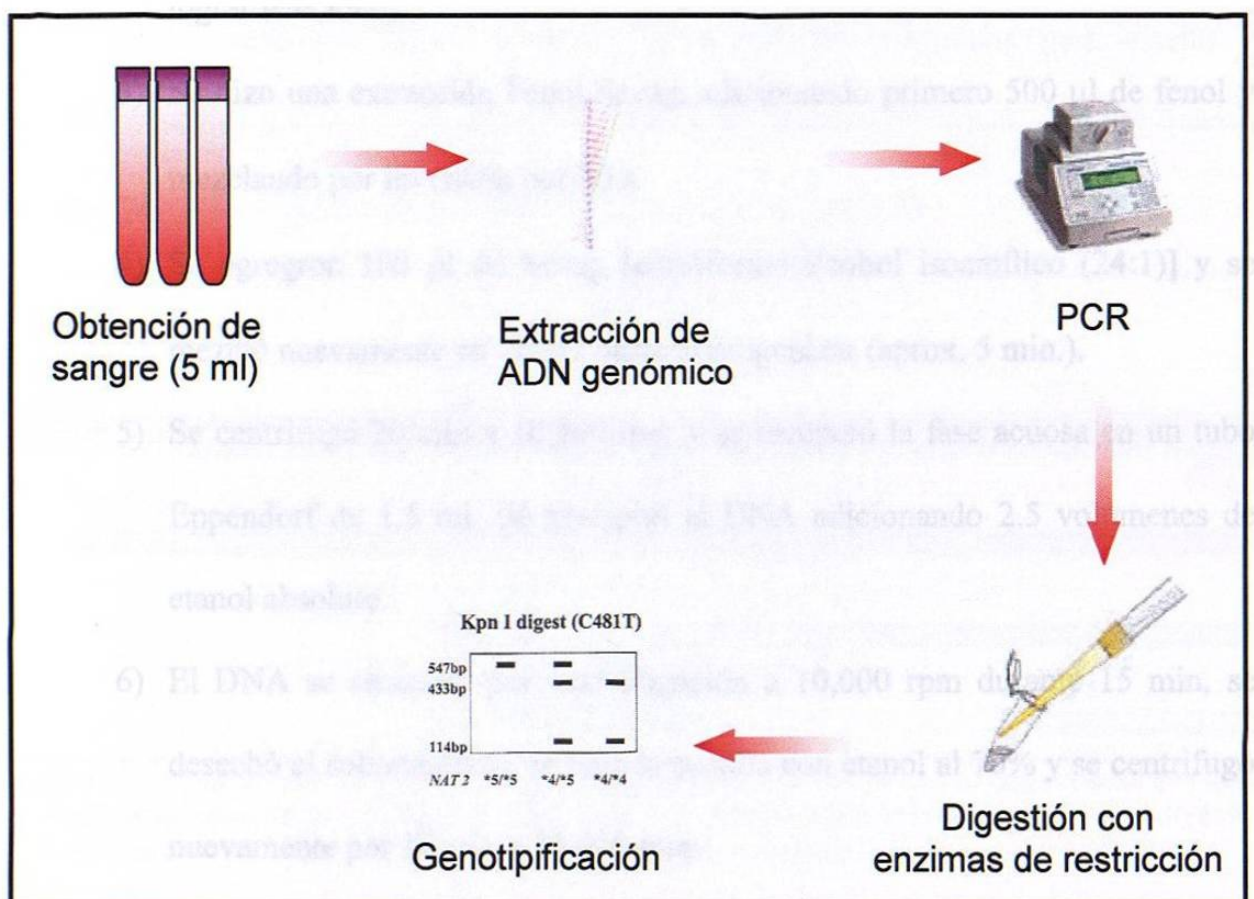


Figura 4. Esquema de la estrategia general.

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 ⁹⁷ que se describe a continuación.

3.2.2.1 Protocolo

- 1) En un tubo Eppendorf de 2.0 ml se colocaron 500 µl de sangre periférica con EDTA.
- 2) Se adicionaron 200 µl 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 µl de fenol y mezclando por inversión por 30 s.
- 4) Se agregaron 100 µl 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 μl de H_2O 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).⁹⁷ 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).

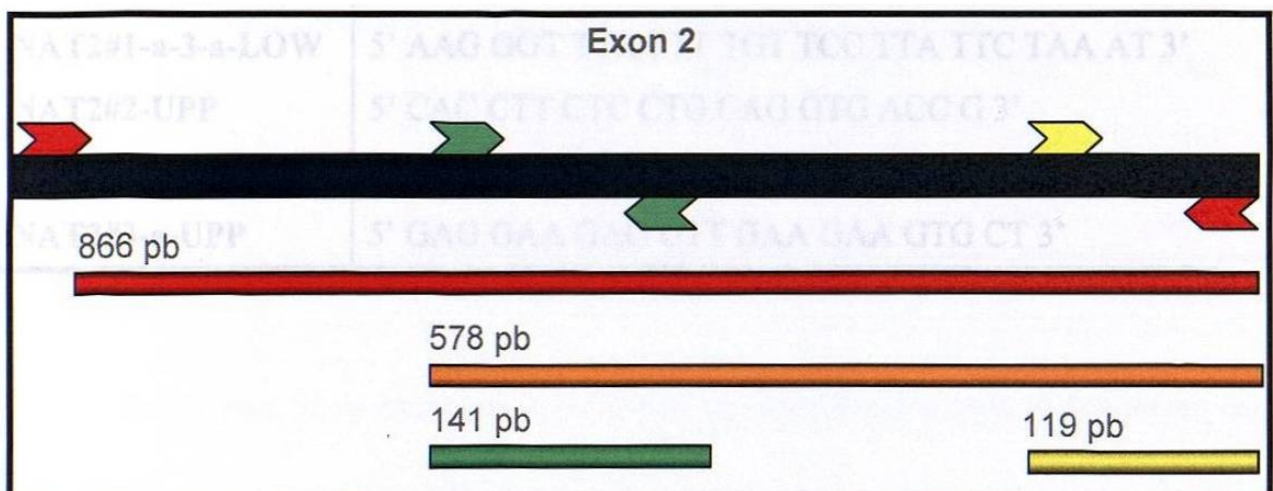


Figura 5. Amplificaciones en el exón 2 de NAT2. El fragmento de 866 pb abarca casi por completo toda la región codificante del gen. El fragmento de 578 pb es la amplificación de las últimas 3/4 partes del exón 2. Los fragmentos de 141 pb y 119 pb se encuentran en la parte media y final del exón respectivamente.

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 ₂	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
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min.
10 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	1 min.
Alineación	53 °C	1 min.
Extensión	72 °C	1 min.
25 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	1 min.
Alineación	55 °C	1 min.
Extensión	72 °C	1 min.
Extensión final	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
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min.
30 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	30 seg.
Alineación	58 °C	30 seg.
Extensión	72 °C	45 seg.
Extensión final	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
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min.
30 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	30 seg.
Alineación	58 °C	30 seg.
Extensión	72 °C	30 seg.
Extensión final	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* A1 I 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	3µl
BSA	1x	3µl
Agua MiliQ	---	2.5µl
PA	---	20µl
<i>Kpn</i> I	5U	0.5µl
<i>Msp</i> A1 I	10U	1µl
	Total	30µl

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 μ l de H₂O 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 μ l
BSA	1x	2 μ l
Agua MiliQ	---	---
PA	---	14.5 μ l
<i>Kpn</i> I	5U	0.5 μ l
<i>Fok</i> I	4U	1 μ l
	Total	20 μ l

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 μ l
Agua MiliQ	---	---
PA	---	15.5 μ l
<i>Dde</i> I	7.5U	1.5 μ l
<i>Hinf</i> I	10U	1 μ l
	Total	20 μ 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.

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.

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.

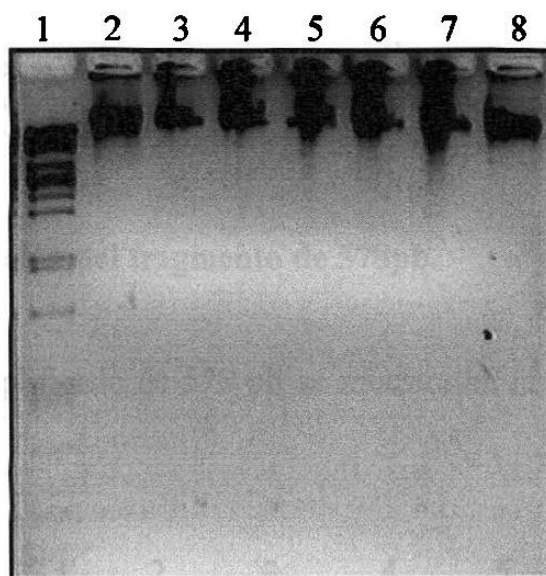


Figura 6. Extracción de DNA genómico. Gel de agarosa al 0.8% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular λ + *Pst* I y de los carriles 2-8: DNA extraído de las muestras de sangre.

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.