



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“RELACIÓN ENTRE LAS VARIANTES
EN EL GEN NAT2, FENOTIPOS
ACETILADORES Y LA TUBERCULOSIS
EN PACIENTES PERUANOS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN GENÉTICA HUMANA

RODRIGO SANCHEZ MACEDO

LIMA - PERÚ

2023

ASESOR

DR. JOSÉ LUIS ROJAS VILCA

JURADO EVALUADOR

Presidente: Dr. Jorge Enrique Rodríguez Bailón

Vocal: Dr. Yasser Ciro Sullcahuaman Allende

Secretario: Dr. Jorge Enrique Osada Liy

A mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al centro de genética de Biología Molecular de la Universidad San Martín de Porres, al Dr. José Rojas y especialmente al Dr. Óscar Acosta por su apoyo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Autofinanciado

RELACIÓN ENTRE LAS VARIANTES EN EL GEN NAT2, FENOTIPOS ACETILADORES Y LA TUBERCULOSIS EN PACIENTES PERUANOS

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	1%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	duict.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.usmp.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	dspace.sheol.uniovi.es Fuente de Internet	<1%
6	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Universidad de San Martín de Porres Trabajo del estudiante	<1%
8	eprints.uanl.mx	

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

Introducción	1
Objetivos	3
Hipótesis	4
Marco teórico	5
Metodología.....	18
Resultados	25
Discusión	33
Conclusiones.....	38
Recomendaciones	39
Limitaciones	40
Bibliografía.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fenotipos de acetilación según el genotipo NAT2	10
Tabla 2: Variables generales.....	20
Tabla 3: Características generales de los pacientes con TBC activa y el grupo control PEL.....	26
Tabla 4: Frecuencias alélicas de 3 polimorfismos NAT2 de pacientes peruanos con TBC activa comparados con el grupo control PEL	27
Tabla 5: Frecuencias genóticas de 03 polimorfismos en NAT2 de pacientes con TBC activa comparados con el grupo control PEL	29
Tabla 6: Frecuencias de los fenotipos acetiladores de pacientes peruanos con TBC activa comparados con el grupo control PEL	31
Tabla 7: Frecuencias alélicas y genóticas del rs1799931 de grupos del proyecto 1000 genomas comparados con peruanos con TBC activo....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vía de metabolismo de la isoniacida.....	8
Figura 2 Alelos para el rs1977731 en el gen NAT2 en pacientes peruanos con TBC activa y comparados con muestra poblacional control PEL..	28
Figura 3 Genotipos para el rs1977731 en el gen NAT2 pacientes peruanos con TBC activa y comparados con muestra poblacional control PEL ..	30
Figura 4 Frecuencias de los fenotipos acetiladores de pacientes peruanos con TBC activo comparado con el proyecto 1000genomas.....	32

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa provocada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*. Es, después del SARS-Cov-2, la segunda causa de muerte en el mundo por un agente infeccioso. La humanidad ha coexistido con el bacilo de la tuberculosis desde hace miles de años, y en el tiempo, tanto bacilo como humanos hemos evolucionado para persistir juntos. Prueba de ello es la fuerte base genética que nos confiere resistencia a la infección por *M. Tuberculosis*, en donde más del 90% de los infectados permanece asintomático.

Este es el primer estudio en nuestro país que evalúa la susceptibilidad a la TBC considerando genes de metabolismo de xenobióticos como NAT2. Se ha buscado establecer la relación entre los polimorfismos rs1799929, rs1799930 y rs1799931 en el gen NAT2, y la progresión de la tuberculosis en pacientes peruanos a través de análisis de asociación entre nuestro grupo de 109 pacientes con TB, obtenidos del hospital Guillermo Almenara, en contraste con un grupo control de 85 peruanos sanos.

Se encontró una asociación significativa para la variante rs1799931 y el desarrollo de tuberculosis. Así como también una asociación entre el fenotipo acetilador lento e intermedio para NAT2 y los pacientes con tuberculosis.

Sin dejar de considerar que la susceptibilidad contra la tuberculosis es multigénica, podemos deducir que en la población peruana la variante rs1799931, la cual se encuentra con más incidencia respecto a otros países, aumenta la probabilidad de desarrollar tuberculosis en nuestra población.

Palabras clave: NAT2, susceptibilidad genética, tuberculosis,

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* bacterium. It is, after SARS-CoV-2, the second leading cause of death worldwide from an infectious agent. Humanity has coexisted with the tuberculosis bacterium for thousands of years, and over time, both the bacterium and humans have evolved to persist together. Proof of this is the strong genetic basis that gives us resistance to *M. Tuberculosis* infection, where more than 90% of infected individuals remain asymptomatic.

This is the first study in our country that evaluates susceptibility to TB considering xenobiotic metabolism genes such as NAT2. We have sought to establish the relationship between the rs1799929, rs1799930, and rs1799931 polymorphisms in the NAT2 gene and the progression of tuberculosis in Peruvian patients through an association analysis between our group of 109 TB patients, obtained from the Guillermo Almenara Hospital, in contrast with a control group of 85 healthy Peruvians.

A significant association was found for the rs1799931 variant and the development of tuberculosis, as well as an association between the slow and intermediate acetylator phenotype for NAT2 and tuberculosis patients. Without neglecting that susceptibility to tuberculosis is multigenic, we can deduce that in the Peruvian population, the rs1799931 variant, which is more common compared to other countries, increases the probability of developing tuberculosis in our population.

Keywords: NAT2, genetic susceptibility, tuberculosis

I. INTRODUCCIÓN

Los últimos reportes estadísticos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sitúan al Perú como el país con más casos diagnosticados de tuberculosis de toda la región de América (119 casos cada 100 000 habitantes) (1). Debido a ello, el Perú se encuentra en un grave problema de salud pública y requiere con urgencia refuerzo de sus políticas de prevención y erradicación de tuberculosis y encontrar nuevas estrategias.

Diversos estudios han identificado poblaciones particularmente susceptibles a desarrollar cuadros clínicos graves una vez infectados. Principalmente se ha identificado una fuerte asociación entre los factores socioeconómicos y el desarrollo de la enfermedad (2), enfatizando que la tuberculosis está extremadamente relacionado a las condiciones de vida del individuo y el ambiente social.

Muchos estudios sugieren que factores genéticos determinan el resultado de la interacción entre el bacilo de la tuberculosis y el huésped. En este sentido, se han estudiado genes que tienen funciones en la respuesta inmunitaria como genes codificantes para receptores de reconocimiento como el *Toll-like Receptor* (TLR), CD4, lectinas tipo C, o receptores de la vitamina D (3)(4). La susceptibilidad de desarrollar tuberculosis activa en caso de contener polimorfismos en alguno de estos genes es mayor. Sin embargo, la tuberculosis es una enfermedad multifactorial, y discernir un conjunto de personas con infección latente que vaya a desarrollar tuberculosis activa es todavía imposible.

El mecanismo de acción para el metabolismo de xenobióticos es otro factor que puede influenciar la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis activa. *NAT2* es uno de los genes involucrados en las vías metabólicas de fármacos de primera línea contra la tuberculosis, y puede también influenciar la predisposición a desarrollar esta enfermedad. (5).

En este estudio intentamos identificar y relacionar factores genéticos para el desarrollo de tuberculosis. Se evaluaron tres variantes en el gen *NAT2*: rs1799929, rs1799930 y rs1799931. Estas variaciones genéticas están relacionadas al desarrollo de reacciones adversas de hepatotoxicidad en pacientes de TB al momento de recibir tratamiento con Isoniazida y Pirazinamida(6)(7). La isoniazida y pirazinamida son fármacos de primera línea contra la tuberculosis. Son metabolizados por el gen N-Acetiltransferasa (*NAT2*), y variaciones en el mismo pueden llevar a distintos fenotipos de acetilación de xenobióticos en el individuo (8). Además, postulamos que las rutas metabólicas asociadas al metabolismo de fármacos antituberculosos pueden asociarse a otra ruta como la inmunológica, y de esta manera impactar la predisposición al desarrollo de tuberculosis.

En nuestro país debido a la alta prevalencia de casos de tuberculosis, y al gran componente amerindio de la población peruana, existe la necesidad de realizar estudios con base genética. La tuberculosis es una enfermedad que afecta principalmente poblaciones marginadas y pobres. El desarrollo de nuevas terapias y los recursos invertidos para su investigación sigue siendo más bajo del necesario (9).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la relación entre los polimorfismos rs1799929, rs1799930 y rs1799931 en el gen NAT2, y la tuberculosis en pacientes peruanos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias de las variantes rs1799929, rs1799930 y rs1799931 en el gen NAT2 en pacientes peruanos con tuberculosis y una muestra control poblacional.
- Determinar las frecuencias de fenotipos acetiladores NAT2 en pacientes peruanos con tuberculosis y muestra control poblacional.
- Evaluar la relación entre los alelos y genotipos rs1799929, rs1799930 y rs1799931 del gen NAT2 y la tuberculosis en pacientes peruanos.
- Evaluar la relación entre los fenotipos acetiladores NAT2 y la tuberculosis en pacientes peruanos.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis alternativa

Ha: Existe relación entre las variantes en el gen NAT2, fenotipos acetiladores, y la tuberculosis en pacientes peruanos.

3.2 Hipótesis nula

Ho: No existe relación entre las variantes en el gen NAT2, fenotipos acetiladores, y la tuberculosis en pacientes peruanos.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad respiratoria que afecta primordialmente los pulmones, como también otras partes del cuerpo: ganglios, riñones, huesos, las articulaciones, entre otras. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de granulomas en los pulmones, las cuales consisten en un conjunto de células inflamatorias, que pueden llegar a inducir una inflamación crónica localizada, llevando a necrosis partes del pulmón y posteriormente hasta la muerte (10). El bacilo *Mycobacterium tuberculosis* es el responsable de causar la enfermedad. En las últimas décadas, distintas cepas de tuberculosis han logrado adaptarse a los denominados medicamentos de primera línea contra la tuberculosis, volviéndose inmune a los fármacos contra la rifampicina, isoniazida y pirazinamida, dando lugar a cepas resistentes como la tuberculosis MDR (*multidrug-resistant tuberculosis*) y la tuberculosis XDR (*extensively drug-resistant tuberculosis*) (11). Estas dos formas resistentes de tuberculosis va en aumento de casos de tuberculosis (12) (13). Perú se mantiene con el índice más alto de muertes por tuberculosis en la región sudamericana con 119 muertes cada 100 000 personas al año (12), siendo Lima la ciudad que concentra más del 75% de todos los casos del país (14).

La severidad de los casos clínicos con tuberculosis varía ampliamente. Todavía es incierto qué factores genéticos determinan que algunas personas desarrollen una tuberculosis activa y otras logren mantenerse asintomáticas. Distintas variantes genómicas asociadas al riesgo de desarrollo de la tuberculosis han sido reportadas (15)(16). Sin embargo, hay poca concordancia entre los loci y variantes de

susceptibilidad a tuberculosis reportados, y es que distintos grupos poblacionales han desarrollado mecanismos propios para contrarrestar la infección del bacilo (17). En 70 000 años de coexistencia con el bacilo, y más de mil millones de muertes solo durante los últimos 2000 años (18) el bacilo de tuberculosis ha ejercido como fuerza mayor de selección natural en la especie humana (19).

4.2 Susceptibilidad genética

Existen numerosos estudios que han investigado la asociación entre determinados polimorfismos y el riesgo de desarrollar tuberculosis. Algunas mutaciones germinales han sido ya identificadas como en los genes IFNGR1, IFNGR2, STAT1, IL12B y TYK, que aumentan el riesgo de síndromes familiares a infecciones de micobacterias y tuberculosis(20). Estos genes tienen un rol crucial en respuestas antimicrobianas y antivirales, al mejorar la presentación de antígenos en células inmunitarias efectoras (21).

4.3 Genes del metabolismo xenobiótico

Los xenobióticos son compuestos químicos extraños al sistema biológico donde se encuentran-Pueden ser causantes de una variedad de enfermedades autoinmunes, cáncer (22)(23). Los organismo cuentan con vías metabólicas de eliminación para inactivar y deshacerse de estos compuestos debido a su toxicidad (24).

Muchos de los genes que codifican enzimas altamente conservadas, presentes en todos los reinos de los seres vivos (25), están involucradas en vías metabólicas de activación, desactivación y eliminación de químicos ambientales tóxicos (26).

Estas enzimas son denominadas enzimas metabolizadoras de xenobióticos (*xenobiotic-metabolising enzymes*, *XME*). Órganos que producen y presentan grandes cantidades de enzimas XME son el pulmón, riñón y el hígado (26)

4.4 N-acetiltransferasa 2 (NAT2)

Existen distintas enzimas metabolizadoras de fármacos que catalizan la activación y detoxificación de fármacos, clasificadas como enzimas fase I y fase II, respectivamente (27). El gen N-acetiltransferasa 2 (*NAT2*) codifica una enzima de fase II. Este grupo de enzimas es caracterizado por reacciones de conjugación, como por ejemplo la transferencia de un grupo acetil. *NAT2* es expresado principalmente en el hígado y codifica la enzima Arilamina N-acetiltransferasa 2 y forma parte del grupo de las enzimas XME 1(28). Al ser *NAT2* altamente polimórfico, históricamente se le ha asociado a diversas condiciones y enfermedades, la más documentada es a la hepatotoxicidad por fármacos contra la tuberculosis (29). La manifestación de los síntomas de hepatotoxicidad inducida por fármacos contra la tuberculosis puede variar enormemente, desde las elevaciones asintomáticas de las enzimas hepáticas hasta insuficiencia hepática fulminante (7) (30). La hepatotoxicidad puede ser causada por la acumulación de metabolitos reactivos que escapan al proceso de desintoxicación, y que al acumularse pueden interferir en el funcionamiento normal de las células, provocando eventualmente lesiones en el órgano (29).

La Arilamina N-acetiltransferasa tiene un rol importante en la metabolización del fármaco antituberculoso Isoniacida (INH), fármaco de primera línea en el

tratamiento contra la tuberculosis (31). *NAT2* es responsable de la acetilación de la isoniacida en acetil-isoniacida, y posteriormente de la acetilación de la acetil hidracina en el compuesto no toxico diacetil hidracina (29). La presencia de uno o más polimorfismos en el gen *NAT2* puede ocasionar un fenotipo acetilador lento, llevando a una acumulación de metabolitos tóxicos como el mono acetil hidracina e Isoniacida (fármaco que en altas concentraciones es perjudicial), pudiendo causar daños hepáticos (32).

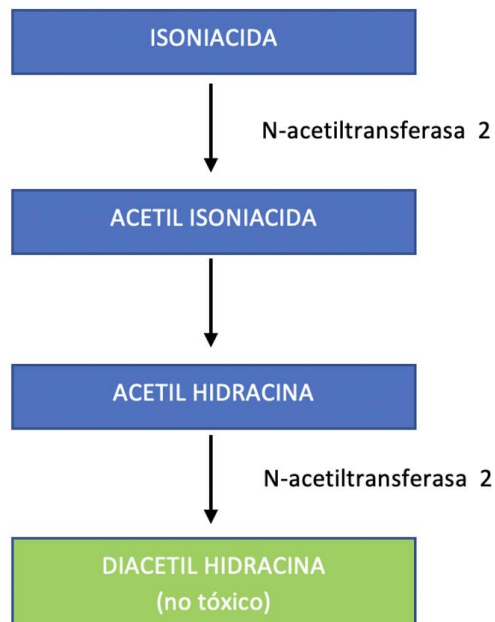


Figura 1 Vía de metabolismo de la isoniacida

4.5 Filogenética de NAT2

Se han identificado 22 genes similares a *NAT2* en al menos 14 especies procariotas y eucariotas, incluyendo el bacilo de la tuberculosis. La catalización de la transferencia de un acetilo de la acetilcoenzima A a una amina aromática, amina heterocíclica o hidracina es por ende esencial para muchas especies, desde bacterias hasta humanos (33). Todas las NATs poseen una secuencia conservada de cisteína, histidina y aspartato. Se hipotetiza que esos tres aminoácidos forman una triada catalítica, siendo la cisteína el aminoácido crucial para la correcta actividad de la enzima (34)(35). Es posible que las secuencias *NAT1* y *NAT2* en el humano, tengan un mismo origen y que se hayan duplicado en algún momento en la evolución, ya que están estrechamente relacionadas (36).

Es importante señalar que muchos estudios de funcionalidad de los genes NAT han sido realizados en ratones. En ratones hay tres isoenzimas NAT: Nat1, Nat2, Nat3 (37), todos con una región de codificación sin intrones, al igual que sus homólogos humanos. El gen murino Nat1 es el relativo a *NAT2* en los humanos.

4.6 Haplotipos NAT2

Al ser el gen *NAT2* altamente heterogéneo, presenta 108 haplotipos reportados a nivel global, siendo el haplotipo NAT2*4 como el haplotipo de referencia, ya que codifica una enzima altamente productiva y eficiente. Los haplotipos son determinados según los *single nucleotide polymorphisms* (SNP) que presenten en el exón 2 (38). Los haplotipos pueden dar un fenotipo acetilador rápido, intermedio y

lento para *NAT2*. La base genética de los fenotipos acetiladores en base a las variantes rs1799929, rs1799930 y rs1799931 está reportada en la tabla 1 (39):

Tabla 1: Fenotipos de acetilación según el genotipo *NAT2*

NAT2*5 rs1799929	NAT2*6 rs1799930	NAT2*7 rs1729931	Genotipo acetilador	Estado acetilador
CC	GG	GG	NAT2*4/4	RA (rápido)
CT	GG	GG	NAT2*4/5	IA (intermedio)
CC	AG	GG	NAT2*4/6	IA
CC	GG	AG	NAT2*4/7	IA
TT	GG	GG	NAT2*5/5	SA (lento)
CT	AG	GG	NAT2*5/6	SA
CT	GG	AG	NAT2*5/7	SA
CC	AA	GG	NAT2*6/6	SA
CC	AG	AG	NAT2*6/7	SA
CC	GG	AA	NAT2*7/7	SA

4.7 Rol endógeno de NAT2

Si bien está bien documentada la función del gen *NAT2* como metabolizador de xenobióticos, el rol endógeno que puede tener este gen no queda claro todavía y muchos estudios recientes se han centrado en intentar descifrarlo.

Cada vez hay más evidencia acerca de la relación entre las enzimas metabolizadoras de xenobióticos y el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes. La expresión de enzimas metabolizadoras de xenobióticos se ha visto alterada en pacientes diabéticos y modelos de ratones diabéticos, e incluso se ha visto alterado el metabolismo de carbohidratos y lípidos (40). La molécula Acetil-CoA, el cofactor de las enzimas NAT, tiene un rol clave en numerosos procesos celulares, controlando el equilibrio entre procesos catabólicos y anabólicos (41). Esta relación del Acetil-Coa y el metabolismo energético podría sugerir también una relación entre las enzimas NAT y metabolismo energético, al ser Acetil-CoA un intermediario metabólico central.

Estudios en ratones cuyos genes *Nat1/Nat2* han sido silenciados a través de manipulación genética, muestran una significativa disminución en la producción de glucosa, sugiriendo que una supresión de los genes NAT puede disminuir la actividad hepática de gluconeogénesis (28).

Un estudio de asociación entre el gen *NAT2* con fenotipos de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 corroboran una relación entre los genes NAT y el proceso de gluconeogénesis (42). Estudios *in vivo* en ratones *knockdown* y *knockout* para el gen *Nat1* (gen murino ortólogo para el *NAT2* en humanos) muestran cómo una disminución de los niveles de *Nat1* provoca un incremento de

los niveles de glucosa, insulina y triglicéridos significativo (en ayunas) (43). Este mismo estudio muestra data de pruebas de tolerancia a la glucosa y pruebas de tolerancia a la insulina en ratones *Nat2 knockout*, los cuales terminan desarrollando resistencia a la insulina.

4.8 NAT2 y neoplasias

La N-acetiltransferasa 2 cataliza la N-acetilación y la O-acetilación de distintos carcinógenos como aminas aromáticas, heterocíclicas e hidrazinas (44). *NAT2* es una enzima fundamental en el proceso de detoxificación y metabolismo de tóxicos ambientales que ingresan en nuestro cuerpo. Muchos estudios señalan una fuerte correlación entre fenotipos de *NAT2* lentos e intermedios con un incremento en el riesgo a desarrollar distintos tipos de neoplasias como cáncer de pulmón, del colon, y de vejiga (45).

4.8.1 Cáncer de pulmón

A pesar de existir muchos estudios con conclusiones contrastantes, aumentan las evidencias que señalan una fuerte correlación entre *NAT2* y el desarrollo de cáncer de pulmón. Un estudio en una población del norte de India sugiere que las personas que presentan una combinación de los siguientes tipos de genes: *NQO1*, *EPCHX1* y *NAT2*; *SULT1A1*, *EPHX1* y *NAT2*; tienen una probabilidad dos veces mayor de desarrollar cáncer de pulmón (46). Un estudio reveló que *NAT2* no solo se expresa en el hígado y en el tracto intestinal, sino también en las células epiteliales del

pulmón (47). Queda todavía por explorar cómo exactamente actúa NAT2 seguido a exposición a carcinógenos.

4.8.2 Cáncer colorrectal

NAT2 está altamente expresado en las células epiteliales del tracto intestinal (48), sugiriendo un rol importante de esta enzima en el intestino. De hecho, pacientes con cáncer colorrectal (CCL) pueden perder la heterocigosidad del brazo 8p22 durante las primeras fases del desarrollo del cáncer. Un paciente heterocigoto que posea un alelo *NAT2* rápido y uno lento, puede perder la variante rápida en las células tumorales, haciendo estas células más sensibles a substratos citotóxicos (49). Numerosos son los estudios que reportan una asociación entre polimorfismos en el gen *NAT2* y el desarrollo de cáncer colorrectal (50)(51). Un estudio reciente revela que un silenciamiento de *NAT2* por parte de microRNA puede atenuar la proliferación, migración e invasión de las células cancerígenas en CCL, en incluso promover la apoptosis (52). La función exacta del gen *NAT2* en el contexto del cáncer colorrectal queda todavía por ser estudiada más a profundidad.

4.8.3 Leucemia linfoide aguda

El gen *NAT2* han sido asociado a un aumento de probabilidad a desarrollar leucemia linfoide aguda. Específicamente los haplotipos *NAT2**5 (341T>C, 481 C>T), *NAT2* *7A (53), y *NAT2**6A, muestran una fuerte asociación (54). Los haplotipos citados generan un fenotipo acetilador lento de *NAT2*. Hasta ahora no existen

estudios que hayan estudiado correlación de alelos del gen NAT2 a alteraciones en el mecanismo epigenético o un aumento en la expresión de ARNm, o con actividad enzimática NAT2.

4.8.4 Cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga ha sido fuertemente asociado con exposición a aminas aromáticas(55). El metabolismo de estas moléculas involucra a las enzimas *NAT1* y *NAT2*, y se ha observado que un fenotipo acetilador lento para NAT2 aumenta la enormemente la probabilidad de desarrollar cáncer de vejiga, aunque esto depende también según la población estudiada (56).

No todos los estudios que analizan la correlación entre los polimorfismos de *NAT2* y el desarrollo de cáncer llegan a la misma conclusión. Algunos resultados son incluso contradictorios y no han llegado a encontrar efecto alguno del gen *NAT2* y el cáncer de pulmón (57)(58). Esto puede deberse en gran medida a la selección de población estudiada, dando a entender que NAT1 es solo uno de los factores, mas no el único, que puede dar susceptibilidad al desarrollo de cáncer.

4.9 NAT2 en trastornos metabólicos

Estudios GWAS (*Genome Wide Associated*) han reportado variantes intrónicas del gen *NAT2* asociadas con un nivel elevado de lípidos y colesterol en el plasma (59) entre ellas, diabetes tipo II (42).

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por la hiperglicemia, debido a una resistencia a la insulina, insuficiente insulina o una secreción excesiva de glucagón. Esta enfermedad es el resultado de factores genéticos y ambientales, y numerosos mecanismos han sido descritos para entender su patogénesis, como la importancia del sistema inmune (60).

Estudios de asociación entre haplotipos de *NAT2* y pacientes con diabetes mellitus tipo I muestran resultados contradictorios. Dependiendo de la población estudiada, se ha encontrado que un fenotipo acetilador rápido del gen *NAT2* está asociado a diabetes tipo I (61). En el caso de la una investigación en la población húngara, no se encontró alguna relación entre la diabetes tipo 1 (62).

Los resultados asociativos entre *NAT2* y diabetes mellitus tipo II (TD2) son en cambio un poco más concluyentes. Irshaid et al. (63) evaluó un grupo de pacientes de Jordania con TD2, y encontró que el haplotipo *NAT2**4/*NAT2**5 es un factor protector y el haplotipo *NAT2**5/*NAT2**6 un factor de riesgo. Una deficiencia en el gen *NAT2* podría, por ende, causar una resistencia a la insulina y dar una predisposición a desarrollar TD2. Se ha observado también *in vitro*, que células de ratones con un silenciamiento en el gen *NAT1* (ortólogo del gen *NAT2* en humanos) provoca una elevación de los niveles de glucosa, insulina y triglicéridos (64). Otros estudios en células murinas, han mostrado que una delección *NAT2* provoca una disminución de la actividad mitocondrial (65). Un malfuncionamiento de la actividad mitocondrial como un aumento del estrés oxidativo, están asociados a un desarrollo de inflamación, resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de lípidos, los cuales son características de enfermedades metabólicas como la obesidad diabetes mellitus tipo 2 (66).

4.10 NAT2 en el sistema inmune

En años recientes se ha revelado una relación entre enfermedades inmunitarias y el metabolismo de fármacos (67). Y aunque todavía no se ha descrito completamente los niveles de expresión de *NAT2* en distintos tejidos, se tiene una idea del rol endógeno que tiene este gen bajo condiciones normales.

Se ha encontrado una mayor expresión de *NAT2* en las células NK (del inglés *Natural Killer*) y monocitos de pacientes tuberculosos, en comparación al grupo control sano ($p < 0.013$), en una población de mestizos mexicanos (68). Las células NK están activas tanto en la fase de infección temprana como tardía del *M. Tuberculosis*. Biopsias de tejido de pulmón de pacientes con tuberculosis muestran cómo las células NK rodean los granulomas, posiblemente para captar células infectadas que escapan del granuloma (69). Dado que la enzima *NAT2* es altamente expresada por parte de las células NK y monocitos, las variaciones en este gen pueden llevar a una incorrecta respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*.

Los múltiples SNPs en el gen *NAT2* han sido sujetos de varias investigaciones en los últimos años y se ha determinado la prevalencia de diversos haplotipos en distintas poblaciones (70). Sin embargo, no se ha encontrado todavía una relación clara entre los fenotipos “acetiladores lentos” versus “acetiladores rápidos” y una predisposición a desarrollar tuberculosis. Los mecanismos de acetilación por los cuales *NAT2* actúa sobre sus substratos xenobióticos podría ser distintas a cómo actúan en las células NK y su influencia en la eficacia de la respuesta inmunológica, o a cómo influye en la sensibilidad sobre la insulina. A pesar de ser *NAT2* uno de

los primeros genes farmacológicos en ser investigados, hoy en día su substrato endógeno es todavía desconocido.

4.11 Mecanismos de regulación de NAT2

La familia de enzimas deacetiladoras Sirtuína (SIRT1 – SIRT7) ha sido estudiada en el contexto de regulación de NAT1 y NAT2 debido a su participación fisiológica en el metabolismo, estrés y envejecimiento (71).

SIRT1 es una enzima deacetiladora, citosólica, involucrada en los procesos de señalización de metabolismo energético y respuesta inmunitaria (72). Puede regular la función de monocitos a través de NF- κ B y PGC-1, aumentando el nivel de NAD⁺ (73). Análisis en células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells, PBMC*) como linfocitos y monocitos, muestran que una activación de la enzima deacetiladora SIRT1 reduce la N-acetilación de fármacos como la Isoniazida por parte de NAT2. Por el contrario, un silenciamiento de SIRT1 aumenta la capacidad de acetilar de NAT2 (74). Esta interacción entre *NAT2* y *SIRT1* puede tener diversas implicaciones fisiológicas como tumorigénesis, reacciones adversas a fármacos, e inmunológicas, ya que el metabolismo de xenobióticos, a los cuales estamos continuamente expuestos, es indispensable para una correcta detoxificación de compuestos potencialmente dañinos para el cuerpo humano. La interacción con la enzima SIRT1 es solo uno de los posibles mecanismo de regulación de las enzimas NAT, y la cual parecer tener un rol importante en sistema inmunitario (75).

V. METODOLOGÍA

5.1 Diseño

El estudio es asociativo (relacional), de diseño observacional (no experimental) comparativo (grupo TBC vs grupo control sin TBC), basado en la información recolectada en un estudio previo. El estudio es analítico y transversal.

5.2 Diseño muestral

5.2.1 Población casos

Se consideran 109 pacientes diagnosticados con tuberculosis, todos peruanos.

5.2.2 Población controles

Se consideran 85 muestras de peruanos, residentes de Lima, sin alguna enfermedad reportada. Los datos y las secuencias provienen del proyecto 1000 Genomas (76).

5.3 Criterios de selección

Considerando un alfa 0.05, y un poder del 81.7%, se calculó un número de muestras de 85. Para el cálculo se tomó como referencia un estudio del Instituto Nacional de Salud (77). Para el presente estudio se analizaron 85 muestras control y 109 pacientes con tuberculosis.

- **Criterios de inclusión:**

- Pacientes con tuberculosis
- Mayores de 18 años
- Peruanos
- Personas que participaron en el proyecto 1000 genomas que tengan secuenciado el gen NAT2
- No emparentados

- **Criterios de exclusión**

- Pacientes con información insuficiente
- Pacientes con otras comorbilidades

5.4 Variables

5.4.1 Variables generales

Tabla 2: Variables generales

Variables	Categoría	Indicadores
Variantes de NAT2	rs1799929	Genotipo CC
		Genotipo CT
		Genotipo TT
	rs1799930	Genotipo GG
		Genotipo GA
		Genotipo AA
	rs1799931	Genotipo GG
		Genotipo GA
		Genotipo AA
Fenotipo acetilador	Fenotipo acetilador rápido	CC-GG-GG
		CT-GG-CC;
	Fenotipo acetilador intermedio	CC-AG-GG;
		C-GG-AG
		TT-GG-GG;
		CT-AG-GG,
Fenotipo acetilador lento	CT-AG-GG;	
	CC-AA-GG,	
	CC-AG-AG;	
	CC-GG-AA	

Tuberculosis	Sí	Pacientes con tuberculosis activa
	No	Datos del proyecto 1000genomas

5.4.2 Covariables

- Sexo

5.5 Técnicas y procedimientos de medición y recolección de datos

5.5.1 Recolección de datos

Los datos utilizados para este estudio son pertenecientes originalmente a una investigación previa, el estudio “Relación de los fenotipos acetiladores del gen NAT2 con la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos en pacientes peruanos”, llevado a cabo por la Universidad San Martín de Porres. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina Humana, Universidad San Martín de Porres. Los pacientes con tuberculosis provinieron del Hospital Guillermo Almenara. Todos los pacientes participaron por voluntad propia en el proyecto de investigación y firmaron un consentimiento informado.

En el estudio citado, las muestras obtenidas se pusieron en etanol absoluto, provocando principalmente que el ADN precipite, y permitiendo así eliminar otras

moléculas de la célula. Se diluyeron los ácidos nucleicos en un buffer TE, y finalmente y se cuantificó y se midió la calidad del ADN en un equipo de espectrometría. Se utilizó el kit GeneJet Genome DNA Purification kit, de la empresa Thermo Scientific, para purificar el ADN. Luego, se amplificaron los fragmentos del exón 2 del gen NAT2 mediante una PCR punto final. Por último, mediante una electroforesis en gel (Agarosa añ 1.5%), se identificaron los amplicones del gen NAT2.

5.5.2 Secuenciamiento Sanger

Para el secuenciamiento por Sanger se utilizó el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), el cual sirvió para amplificar nuevamente los amplicones del exón 2 del gel NAT2. Una vez amplificado, se purificó el producto una vez más, con una solución EDTA 125mM y etanol absoluto. Se hizo precipitar las muestras en una centrífuga refrigerada (a 3500 RPM), y finalmente se resuspendieron las muestras en formamida y se llevó al equipo de secuenciación (ABI-3500).

5.5.3 Next Generation Sequencing (NGS)

Las muestras también fueron secuenciadas mediante la técnica de secuenciación masiva NGS (*target sequencing* y *exome sequencing*). Los equipos utilizados fueron MiSeq y NexSeq Illumina. Con esta técnica se obtuvieron librerías de genes

para cada paciente, las cuales fueron analizadas con herramientas bioinformáticas (PRINSEQ, TRIMGALORE, TRIMOMATIC y SAMTOOLS). Se elaboró un *pipeline* bioinformático *in house* del Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular, de la Universidad San Martín de Porres. Al finalizar este análisis se obtuvo una anotación de las variantes encontradas más relevantes y se predijo sus efectos sobre el gen.

5.6 Análisis de datos

Los datos y secuencias del grupo control ha sido obtenidos del proyecto de 1000 genomas. Se utilizaron solo muestras provenientes de paciente peruanos que tengan el gen NAT2 secuenciado. Los datos fueron analizados mediante el software estadístico Epidat 2.0 y R.

5.6.1 Métodos

Se calculó el valor de la potencia de asociación de las muestras mediante el software Epidat 3.1, la potencia de riesgo para los polimorfismos del gen NAT2 se obtuvieron en base a las frecuencias alélicas reportadas en el estudio de frecuencias alélicas y genotípicas en un cohorte de pacientes con tuberculosis peruanos (77).

El valor de Odd Ratio y del chi cuadrado para los análisis en este estudio, fueron calculados utilizando los paquetes dplyr, epiR y Tidyverse en R. El programa Epidat 3.1 fue utilizado sucesivamente para corroborar los resultados obtenidos.

5.7 Aspectos éticos

La presente investigación ha sido revisada por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para su aprobación y ejecución.

Los datos de pacientes tuberculosos provienen de un proyecto de investigación previo de la Universidad San Martín de Porres: “Relación de los fenotipos acetiladores del gen NAT2 con la injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos en pacientes peruanos”.

Los datos han sido recolectados de forma anónima. Se precisa además que cada paciente firmó un consentimiento informado donde se le explicaba el fin del proyecto y posibles investigaciones que podrían derivar de este.

VI. RESULTADOS

6.1 Características generales de los pacientes

Para la investigación se consideraron un total de 109 pacientes con tuberculosis activa, provenientes del Hospital Essalud Guillermo Almenara de Lima. De dichos pacientes se recolectó muestras de sangre, de las cuales se extrajo el ADN.

El 41.2% de los pacientes son mujeres y 58.8% varones, con un rango de edad entre los 18 a los 84 años. Para el grupo control utilizamos los datos disponibles para el proyecto 1000 genomas (76) específicamente el grupo PEL (Peruanos de Lima). La edad específica del grupo control no se considera. Las características de los pacientes y del grupo control se encuentran resumidas en la tabla 3.

Tabla 3: Características generales de los pacientes con TBC activa y el grupo control PEL

	Pacientes	Grupo control
Sexo M	64	41
Sexo F	45	44
Edad en años	16 - 84	-
Diagnóstico	Sí	No
Condición de tuberculosis	Activa	No activa
Tratamiento	Sí	-
Tipo de muestra	Bucal y/o sangre	Sangre
Lugar de muestreo	Lima	Lima

6.2 Variantes en el gen NAT2

6.2.1 Alelos NAT2

Dentro del gen *NAT2* analizamos específicamente tres variantes: rs1799929, rs1799930, rs1799931. Las frecuencias alélicas de pacientes y de controles están reportadas en la tabla 4. Calculamos el *Odd Ratio* (OR) para cada variante entre pacientes y controles, y obtuvimos unos valores OR de 0.82 [0.52 -1.31] y 0.88

[0.42-1.83] y valores p de 0.47 y 0.44 para las variantes rs1799929, rs1799930 rs1799931, respectivamente.

Para la variante rs1799931, sin embargo, se obtuvo un valor de OR = 3.04 [1.88 – 4.9], $p = 0.000$, mostrando una relación significativa y ser factor de riesgo para desarrollar tuberculosis activa.

Tabla 4: Frecuencias alélicas de 3 polimorfismos NAT2 de pacientes peruanos con TBC activa comparados con el grupo control PEL

Variantes (efecto)	Alelo referencia / Alelo variante	Posición / Cambio proteína	Alelos	Pacientes TBC n (%)	Grupo control	P^*	OR [IC 95%]
rs1799929 (sinónima)	C/T	p.L161L	C	168 (77.1)	125 (73.5)	0.47	0.82 [0.52 - 1.31]
			T	50 (22.9)	45 (26.5)		
rs1799930 (missense)	G/A	p.R197Q	G	202 (92.6)	156 (91.7)	0.44	0.88 [0.42- 1.83]
			A	16 (7.3)	14 (8.3)		
rs1799931 (missense)	G/A	p.G286E	G	132 (60.6)	140 (82.4)	0.000	3.04 [1.88 – 4.9]
			A	86 (39.4)	30 (17.6)		

* Según prueba X^2

La figura 2 resume las frecuencias encontradas en pacientes y controles para la variante rs1799931. El alelo A se encuentra en un 39.4% mientras que, en el grupo control, se obtuvo un 17.6%. Los pacientes peruanos con TBC activo muestran la presencia del alelo A por casi al doble, respecto a la población control.

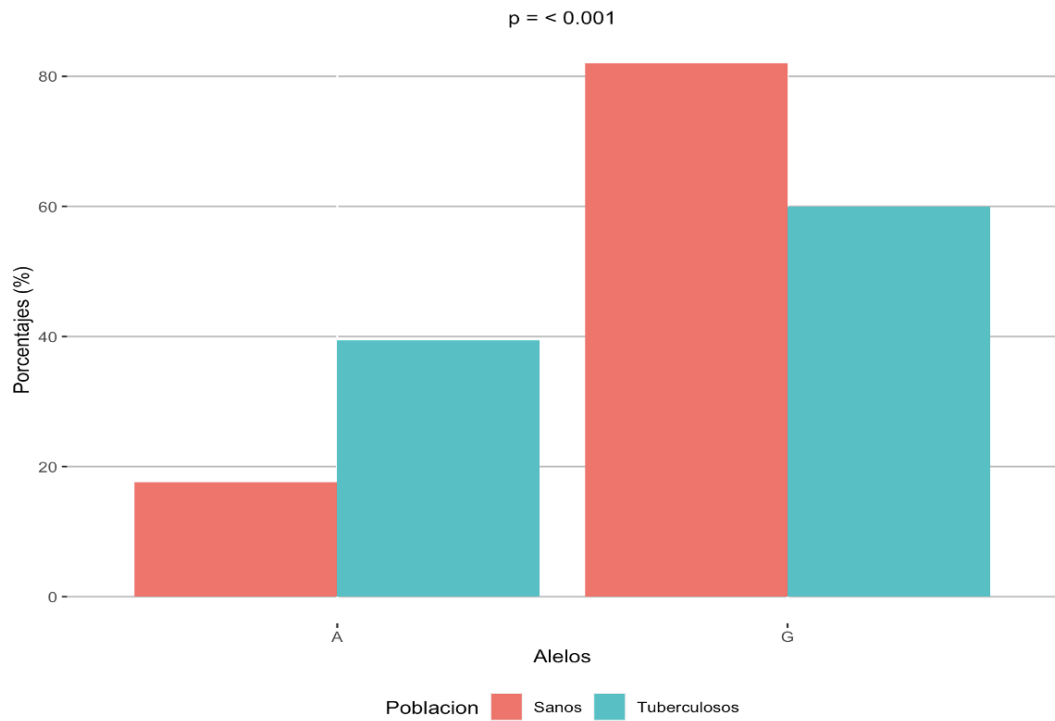


Figura 2 Alelos para el rs1977731 en el gen NAT2 en pacientes peruanos con TBC activa comparados con el grupo control PEL

6.2.2 Genotipos NAT2

Las frecuencias genotípicas de los 03 polimorfismos se reportan en la tabla 5.

Tabla 5: Frecuencias genotípicas de 03 polimorfismos en NAT2 de pacientes con TBC activa comparados con el grupo control PEL

Variantes (efecto)	Alelo referencia / Alelo variante	Posición / Cambio de proteína	Genotipos	Pacientes con TBC n (%)	Grupo control	P*	OR [IC 95%]
rs1799929 (sinónima)	C/T	p.L161L	CC	61 (55.9)	43 (50.6)	0.47	1.24 [0.70 – 2.18]
			CT	46 (42.3)	39 (45.8)		
			TT	2 (1.8)	3 (3.6)		
rs1799930 (missense)	G/A	p.R197Q	GG	93 (85.3)	71 (83.5)	0.84	0.88 [0.40-1.90]
			AG	16(14.7)	14 (16.5)		
			AA	0 (0)	0 (0)		
rs1799931 (missense)	G/A	p.G286E	GG	34 (31.1)	62 (72.9)	0.000	5.94 [3.17 – 11.09]
			AG	64 (58.7)	16 (18.8)		
			AA	11 (10.1)	7 (8.3)		

Se consideran 02 categorías: CC vs CT+TT (rs1799929), GG vs AG+AA (rs1799930) y GG vs AG+AA (rs1799931).

* Según prueba χ^2 . Para el rs1799931 ni la población control ni la población de pacientes se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg

Para los genotipos de los polimorfismos rs1799929 y rs1799931, al agruparlos en 02 categorías: genotipo homocigoto silvestre y genotipo homocigoto mutante + heterocigoto, no se encontró relación con el desarrollo de tuberculosis activa, los valores de OR obtenidos son de 1.24 [0.70 – 2.18] y 0.88 [0.40-1.90] para las variantes rs1799929 y rs1799930 respectivamente.

Para la variante rs1799931 se obtuvo un OR = 5.94 [3.17 – 11.09] y un valor $p < 0.0001$, indicando una fuerte asociación entre los genotipos AG y GG, y la tuberculosis. La figura 3 muestra como el genotipo “AG” es prevalente en pacientes comparado con el grupo control (58.7% y 18.8%, respectivamente).

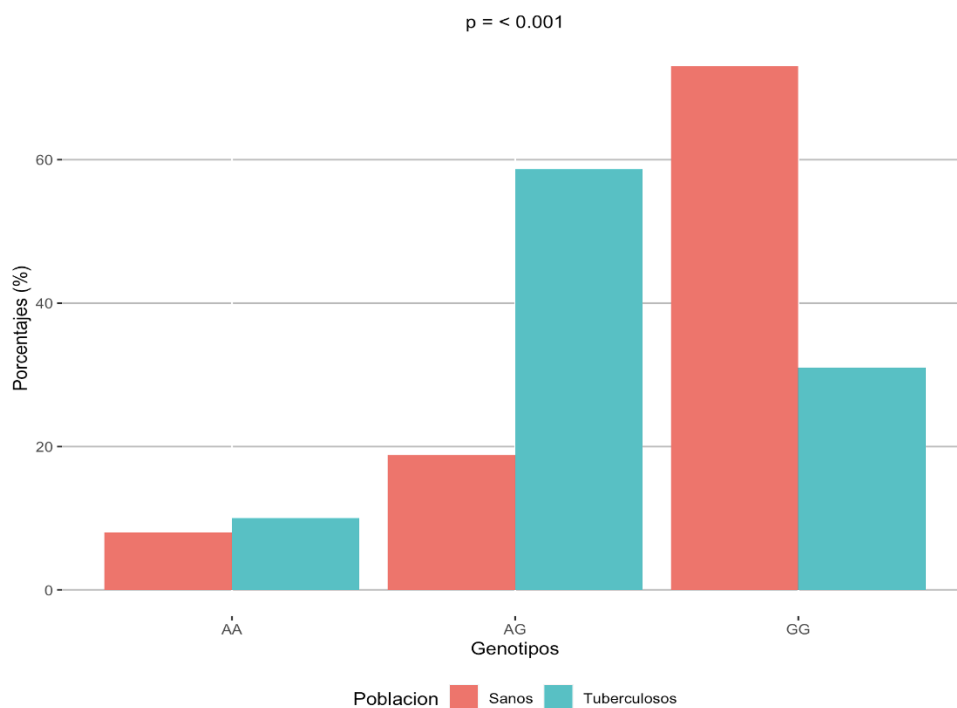


Figura 3 Genotipos para el rs1977731 en el gen NAT2 pacientes peruanos con TBC activa y comparados con el grupo control PEL

6.2.3 Fenotipos acetiladores NAT2

Se analizaron y compararon los fenotipos acetiladores entre pacientes y el grupo control. Se determinó el fenotipo acetilador de cada paciente en base a la combinación de genotipos de los 03 polimorfismos rs1799929, rs1799930, rs1799931. Los fenotipos acetiladores se encuentran resumidas en la tabla 6.

Tabla 6: Frecuencias de los fenotipos acetiladores de pacientes peruanos con TBC activa comparados con el grupo control PEL

Fenotipo acetiladores	Pacientes con TBC n (%)	Grupo control n (%)	<i>p</i>*	OR [IC 95%]
IA + SA	101 (92.6)	68 (80)	0.009	0.32 [0.13 - 0.78]
RA	8 (7.4)	17 (20)		

RA: Acetilador rápida, IA: Acetilador intermedio, SA: Acetilador lento. * Según prueba X^2 .

Se agruparon los fenotipos de acetilación intermedia y acetilación lenta, y se compararon con el fenotipo de acetilación rápida. Se obtuvo un valor OR = 0.32 [0.13 – 0.78], indicando que el fenotipo acetilador rápido (RA) es un factor protector ante el desarrollo de una tuberculosis activa.

Las frecuencias fenotípicas se encuentran graficadas en la figura 3. El 92.6% de los pacientes presentaron un fenotipo acetilador lento (SA) o intermedio (IA). En el grupo control, el 80% presentó fenotipo SA o IA. Con respecto al fenotipo

acetilador rápido (RA), el 7.4% de los pacientes con TBC presentaron este fenotipo, en comparación a un 20% en el grupo control.

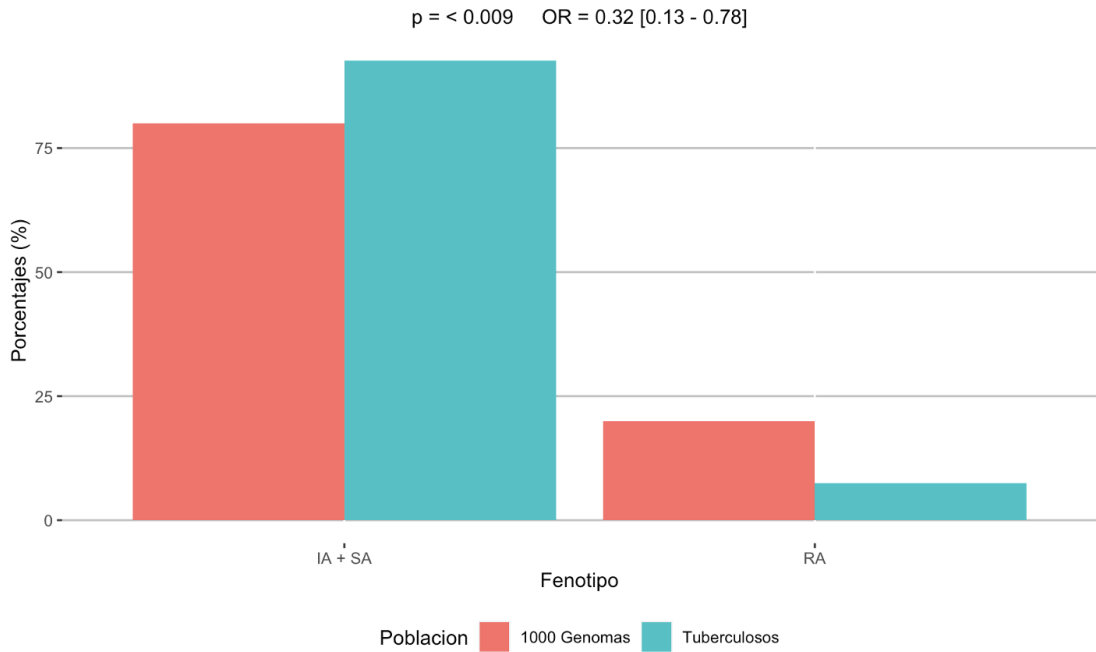


Figura 4 Frecuencias de los fenotipos acetiladores de pacientes peruanos con TBC activo comparado con el proyecto 1000genomas

VII. DISCUSIÓN

En esta investigación evaluamos el gen NAT2, previamente vinculado a injuria hepática inducida por fármacos antituberculosos (78)(31).

A conocimiento de la investigación, este es el primer estudio en el Perú donde se ha estudiado una relación entre los polimorfismos en el gen NAT2, fenotipos acetiladores, y su relación con el desarrollo de la tuberculosis activa. El análisis involucró 109 muestras correspondientes a pacientes del Hospital Guillermo Almenara. Los polimorfismos rs1799929, rs1799930, rs1799931 del gen NAT2 fueron analizados, los cuales permitieron identificar el fenotipo acetilador de cada paciente.

Los genotipos que presentan la variante rs1799931 (heterocigotos u homocigotos mutantes) mostraron tener una relación con la población de pacientes que desarrollaron TBC, con un OR = 5.94 (95% CI = 3.17 – 11.09. Rs1799931 es una variante de tipo *missense*, posicionada en el exón 2, en donde el aminoácido glicina es reemplazado por un ácido glutámico en la posición 286. La posición 286 se encuentra adyacente al sitio activo de la enzima, y reemplazar la glicina con un ácido glutámico puede alterar significativamente la apertura del sitio activo debido a los choques estéricos con los residuos cercanos y la pérdida de un residuo altamente flexible, como lo es la glicina (79). Esto podría explicar por qué portadores de esta variante son propensas a tener una enzima NAT2 con un fenotipo acetilador lento o intermedio, ya que el substrato no logra enlazarse adecuadamente a la proteína.

Las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs1799931, de los pacientes con TBC, mostraron ser significativamente diversas a las de otras poblaciones en otros continentes, como se muestra en la tabla 7. Vemos cómo el genotipo heterocigoto y homocigoto para la variante 1799931 en los pacientes con TBC (58.7% para el genotipo GA y 10% para el genotipo AA) muestran ser significativamente distinta a la de poblaciones de Europa, América y África, como se observa en la tabla 7.

**Tabla 7: Frecuencias alélicas y genotípicas del rs1799931 de grupos del proyecto
1000 genomas comparados con peruanos con TBC activo**

Continent e	N	Alelo n (%)		<i>p</i> *	Genotipo n (%)			<i>p</i> *
		G	A		GG	GA	AA	
Pacientes	109	132 (60)	86 (40)	-	34 (31)	64 (58.7)	11 (10)	-
Europa	506	983 (98)	23 (2)	<0.001	480 (95.4)	26 (4.6)	-	<0.001
América	347	616 (89)	78 (11)	<0.001	278 (80)	60 (17.3)	9 (2.7)	<0.001
África	661	1284 (97)	38 (3)	<0.001	623 (94.3)	38 (5.7)	-	<0.001

* Según prueba X^2 . Todas las frecuencias de poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto por la población de pacientes.

Un ejemplo son los reportes de una asociación inversa entre genotipos rápidos del gen NAT2 y adenomas colorrectales, en personas afroamericanas donde se señala a estos fenotipos como factores de protección. Y sin embargo en poblaciones caucásicas estos mismos genotipos se asocian a un mayor riesgo para el desarrollo de estas enfermedades (80).

Con respecto al rol endógeno de NAT2, todavía sigue siendo incierto su función. Algunos estudios sugieren su implicación en la respuesta inmune contra el bacilo de la tuberculosis. Se ha detectado una alta expresión de NAT2 en las células NK durante la respuesta a la infección de tuberculosis, y un fenotipo acetilador lento podría tener un impacto perjudicial en la correcta eliminación de la bacteria. Se ha visto también que una desregulación de la enzima NAT2 en las células PBMC puede tener repercusiones importantes inmunológicas (74).

La hipótesis que existe relación entre las variantes en NAT2 (y sus distintos fenotipos de acetilación) con el desarrollo de la tuberculosis es sostenida por nuestro segundo análisis, mostrado en la tabla 4. Donde vemos cómo pacientes que presentan un fenotipo acetilador rápido pueden relacionarse con mayor protección ante la presencia de la enfermedad. El OR = 0.32 (95% IC = 0.13 – 0.78) indica que los fenotipos de acetilación rápida son un factor protector contra la tuberculosis activa en la población estudiada.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes peruanos con TBC activa muestran ser significativamente diferentes a otras poblaciones, como se muestra en la tabla 5. Estas diferencias poblacionales en la patogénesis de la tuberculosis resaltan la importancia de los grupos étnicos todavía poco representados en los

estudios genéticos. Ya son numerosos los estudios que indican que el desarrollo de la infección del *M. Tuberculosis* está condicionado por el bagaje genético de la persona (81)(82).

Las frecuencias genotípicas de los pacientes y controles para la variante rs1799931 no se encuentran en equilibrio con el modelo Hardy-Weinberg (HW). Este dato es más llamativo cuando se realiza el mismo análisis para frecuencias genotípicas de poblaciones europeas, africanas y sudamericanas y se constata que estas sí se encuentran en equilibrio HW. Es posible que las frecuencias genotípicas de pacientes y controles, provenientes de la región Lima, estén en desequilibrio con el modelo HW por influencia del bacilo de la tuberculosis, el cual esté ejerciendo como factor de selección natural (83)(84).

En más de 70 000 años de coexistencia con el bacilo de la tuberculosis, es probable que como especie humana hayamos desarrollado inmunidad y explicando así por qué la gran mayoría de casos de infección permanecen como una tuberculosis inactiva. Estos mecanismos de inmunidad parecen haberse desarrollado de manera independiente en los distintos grupos poblacionales.

Esto daría explicación a los resultados y conclusiones contradictorios en los distintos estudios. Estudios de predisposición genética con respecto a la tuberculosis se han focalizado en genes relacionados al sistema inmune. Sin embargo, solo en los últimos años el gen NAT2 ha empezado a ser considerado en este ámbito. Ya existen reportes que asocian la ascendencia genética peruana nativa a un mayor riesgo de progresión de la TB (independientemente de factores de riesgo ambientales como los sociodemográficos) (17). La tuberculosis es considerada una

enfermedad crónica degenerativa y son varios los factores los que determinan su evolución, en donde están involucrados diferentes mecanismos de la inmunidad.

NAT2 podría tener un rol central en la función de células PBMC y NK, y un fenotipo acetilador deficiente de esta enzima podría aumentar las probabilidades de desarrollo de algunas enfermedades metabólicas y de carcinomas.

Es importante mencionar que dentro de las limitaciones de este estudio se encuentran diversos factores. El grupo de pacientes analizados no cuenta con análisis sobre la cepa del bacilo que afecta al paciente. Un paciente podría no ser susceptible a una cepa de tuberculosis no agresiva, pero sí a extra o multirresistente puede.

En este estudio se analizaron 3 variantes presentes en el gen *NAT2*, y al ser la tuberculosis una enfermedad multifactorial, se desconoce si tanto en el grupo de pacientes como en el grupo, estén presentes otras variaciones genéticas que puedan influenciar, además de las variantes analizadas en *NAT2*, la susceptibilidad de cada individuo.

Por último, he de mencionar que la edad también puede ser un factor condicionante al momento de desarrollar tuberculosis, la cual se desconoce para el grupo control.

Pese a las limitaciones el presente estudio contribuye al crecimiento de evidencias y factores que tienen una función compleja, más allá del metabolismo de xenobióticos. Es recomendable continuar con estudios que analicen un panel más amplio de genes, y que tengan en consideración *NAT2*.

CONCLUSIONES

Se encontró una relación entre el desarrollo de la tuberculosis y la variante rs1799931 en el gen *NAT2*, en pacientes peruanos. Así mismo, una vez determinado el fenotipo acetilador de pacientes y controles, se encontró que los fenotipos de acetilación lenta e intermedia también muestran una asociación significativa con el grupo de pacientes con tuberculosis.

Las frecuencias alélicas y fenotípicas de la muestra de pacientes muestran ser significativamente diferentes al resto de poblaciones europeas, africanas y americanas.

Sin dejar de considerar que la susceptibilidad contra la tuberculosis es multigénica, podemos deducir que en esta muestra peruana la variante rs1799931, la cual se encuentra con más incidencia respecto a otros países, aumenta la probabilidad de desarrollar tuberculosis.

VIII. RECOMENDACIONES

Una ampliación del número de muestras es recomendable para mayor asertividad en los resultados obtenidos. Una mejor caracterización de los pacientes por tuberculosis ayudaría a poder establecer o descartar relaciones más específicas entre las variantes analizadas y las características de los pacientes. Las enfermedades infecciosas como la tuberculosis se desarrollan bajo distintas fases como el traspaso de las células epiteliales, expansión del patógeno, persistencia del bacilo, reactivación y retransmisión. Cada una de las fases citadas es controlada por factores intrínsecos al huésped (85). Podemos concluir que la susceptibilidad a la tuberculosis es altamente poligénica y es recomendable también ampliar en el análisis el número de genes estudiados, como *SIRT1*, *SULT1A1*, *SLC11A1*, *VDR* o *ASAP1* (86).

IX. LIMITACIONES

Factores limitantes de esta investigación son el número reducido de muestras, tanto de pacientes como de la población control. La imposibilidad de conocer específicamente qué cepa afecta a los pacientes también es un factor importante. He de mencionar también que la falta de información en cuanto a edad y situación socioeconómica de cada paciente y control, son factores que pueden ser condicionantes en la susceptibilidad de una persona a desarrollar tuberculosis.

Por último, al grupo control idealmente se debería hacer un seguimiento, ya que es posible que tengan el bacilo inactivo y desarrollen con el tiempo, la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. World Health Statistics 2021.
2. San Pedro A, Oliveira RM de. [Tuberculosis and socioeconomic indicators: systematic review of the literature]. *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health*. 2013 Apr;33(4):294–301.
3. Fol M, Druszczynska M, Wlodarczyk M, Ograczyk E, Rudnicka W. Immune response gene polymorphisms in tuberculosis. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(4):633–40.
4. Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, Bah B, Sillah J, Gustafson P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. *J Infect Dis*. 2004 Nov 1;190(9):1631–41.
5. Li P, Gu Y, Li J, Xie L, Li X, Xie J. Mycobacterium tuberculosis Major Facilitator Superfamily Transporters. *J Membr Biol*. 2017 Dec;250(6):573–85.
6. Herrera-Rodulfo A, Carrillo-Tripp M, Laura Yeverino-Gutierrez M, Peñuelas-Urquides K, Adiene González-Escalante L, Bermúdez de León M, et al. NAT2 polymorphisms associated with the development of hepatotoxicity after first-line tuberculosis treatment in Mexican patients: From genotype to molecular structure characterization. *Clin Chim Acta*. 2021 Aug;519:153–62.
7. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WCM, van der Ven AJAM, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Feb;23(2):192–202.
8. Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW. Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis*. 2007 Aug;28(8):1665–71.
9. de Araújo RV, Santos SS, Sanches LM, Giarolla J, El Seoud O, Ferreira EI. Malaria and tuberculosis as diseases of neglected populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115:e200229.
10. Guinn KM, Rubin EJ. Tuberculosis: Just the FAQs. Darwin KH, editor. *mBio*. 2017 Dec 29;8(6):e01910-17.
11. Khawbung JL, Nath D, Chakraborty S. Drug resistant Tuberculosis: A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2021 Feb;74:101574.
12. Santos-Lazaro D, Gavilan RG, Solari L, Vigo AN, Puyen ZM. Whole genome analysis of extensively drug resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Peru. *Sci Rep*. 2021 May 4;11(1):9493.

13. Can Sarınoğlu R, Sili U, Eryüksel E, Olgun Yildizeli S, Cimsit C, Karahasan Yagci A. Tuberculosis and COVID-19: An overlapping situation during pandemic. *J Infect Dev Ctries.* 2020 Jul 31;14(7):721–5.
14. Ivany E, Boulton J. Challenges in tuberculosis management in Peru and England. *Br J Nurs Mark Allen Publ.* 2014 Nov 6;23(20):1079–83.
15. Thye T, Vannberg FO, Wong SH, Owusu-Dabo E, Osei I, Gyapong J, et al. Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat Genet.* 2010 Sep;42(9):739–41.
16. Luo Y, Suliman S, Asgari S, Amariuta T, Baglaenko Y, Martínez-Bonet M, et al. Early progression to active tuberculosis is a highly heritable trait driven by 3q23 in Peruvians. *Nat Commun.* 2019 Aug 21;10(1):3765.
17. Asgari S, Luo Y, Huang CC, Zhang Z, Calderon R, Jimenez J, et al. Higher native Peruvian genetic ancestry proportion is associated with tuberculosis progression risk. *Cell Genomics.* 2022 Jul 13;2(7):100151.
18. Paulson T. Epidemiology: A mortal foe. *Nature.* 2013 Oct 10;502(7470):S2-3.
19. Sironi M, Cagliani R, Forni D, Clerici M. Evolutionary insights into host-pathogen interactions from mammalian sequence data. *Nat Rev Genet.* 2015 Apr;16(4):224–36.
20. Jiao L, Song J, Chen H, Gu D, Liao S, Zhou J, et al. Genetic architecture of tuberculosis susceptibility: A comprehensive research synopsis, meta-analyses, and epidemiological evidence. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2022 Oct;104:105352.
21. van de Wetering D, de Paus RA, van Dissel JT, van de Vosse E. Functional analysis of naturally occurring amino acid substitutions in human IFN-gammaR1. *Mol Immunol.* 2010 Feb;47(5):1023–30.
22. Burkhardt H, Kalden JR. Xenobiotic immunosuppressive agents: therapeutic effects in animal models of autoimmune diseases. *Rheumatol Int.* 1997;17(3):85–90.
23. Tamási V, Monostory K, Prough RA, Falus A. Role of xenobiotic metabolism in cancer: involvement of transcriptional and miRNA regulation of P450s. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2011 Apr;68(7):1131–46.
24. Croom E. Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;112:31–88.
25. Mascotti ML, Lapadula WJ, Juri Ayub M. The Origin and Evolution of Baeyer—Villiger Monooxygenases (BVMOs): An Ancestral Family of Flavin Monooxygenases. *PLoS ONE.* 2015 Jul 10;10(7):e0132689.
26. Zhang JY, Wang Y, Prakash C. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human lung. *Curr Drug Metab.* 2006 Dec;7(8):939–48.
27. Caracterización del genotipo N-ACETIL Transferasa 2 (NAT2) en una muestra de la población del noreste de México. :118.

28. Denis RGP, Busi F, Castel J, Morel C, Zhang W, Bui LC, et al. A readout of metabolic efficiency in arylamine N-acetyltransferase-deficient mice reveals minor energy metabolism changes. *FEBS Lett.* 2019 Apr;593(8):831–41.
29. Ramappa V, Aithal GP. Hepatotoxicity Related to Anti-tuberculosis Drugs: Mechanisms and Management. *J Clin Exp Hepatol.* 2013 Mar;3(1):37–49.
30. Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Semin Liver Dis.* 2002;22(2):145–55.
31. Richardson M, Kirkham J, Dwan K, Sloan DJ, Davies G, Jorgensen AL. NAT2 variants and toxicity related to anti-tuberculosis agents: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* 2019 Mar 1;23(3):293–305.
32. Scales MD, Timbrell JA. Studies on hydrazine hepatotoxicity. 1. Pathological findings. *J Toxicol Environ Health.* 1982 Dec;10(6):941–53.
33. Butcher NJ, Boukouvala S, Sim E, Minchin RF. Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacogenomics J.* 2002;2(1):30–42.
34. Sinclair JC, Sandy J, Delgoda R, Sim E, Noble ME. Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nat Struct Biol.* 2000 Jul;7(7):560–4.
35. Dupret JM, Grant DM. 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.* 1992 Apr 15;267(11):7381–5.
36. Upton A, Johnson N, Sandy J, Sim E. Arylamine N-acetyltransferases - of mice, men and microorganisms. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Mar;22(3):140–6.
37. Kelly SL, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase in Balb/c mice: identification of a novel mouse isoenzyme by cloning and expression in vitro. *Biochem J.* 1994 Sep 1;302 (Pt 2)(Pt 2):347–53.
38. Sabbagh A, Darlu P, Crouau-Roy B, Poloni ES. Arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic diversity and traditional subsistence: a worldwide population survey. *PloS One.* 2011 Apr 6;6(4):e18507.
39. Xiang Y, Ma L, Wu W, Liu W, Li Y, Zhu X, et al. The incidence of liver injury in Uyghur patients treated for TB in Xinjiang Uyghur autonomous region, China, and its association with hepatic enzyme polymorphisms nat2, cyp2e1, gstm1 and gstm1. *PloS One.* 2014;9(1):e85905.
40. Rossner R, Kaeberlein M, Leiser SF. Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes. *J Biol Chem.* 2017 Jul 7;292(27):11138–46.
41. Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* 2015 Jun 2;21(6):805–21.

42. Chan KHK, Huang YT, Meng Q, Wu C, Reiner A, Sobel EM, et al. Shared molecular pathways and gene networks for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus in women across diverse ethnicities. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Dec;7(6):911–9.
43. Knowles JW, Xie W, Zhang Z, Chennemsetty I, Assimes TL, Paananen J, et al. Identification and validation of N-acetyltransferase 2 as an insulin sensitivity gene. *J Clin Invest*. 2015 Apr 1;125(4):1739–51.
44. Hein DW. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Aug 3;948(1):37–66.
45. Borlak J, Reamon-Buettner SM. N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in colon and lung cancer patients. *BMC Med Genet*. 2006 Jul 9;7:58.
46. Walia HK, Sharma P, Singh N, Sharma S. Synergistic polymorphic interactions of phase II metabolizing genes and their association toward lung cancer susceptibility in North Indians. *Int J Environ Health Res*. 2022 Oct 17;1–24.
47. Wise JTF, Salazar-González RA, Habil MR, Doll MA, Hein DW. Expression of arylamine N-acetyltransferase 2 activity in immortalized human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2022 May 1;442:115993.
48. Windmill KF, Gaedigk A, Hall PM, Samaratunga H, Grant DM, McManus ME. Localization of N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2000 Mar;54(1):19–29.
49. Rendo V, Stoimenov I, Mateus A, Sjöberg E, Svensson R, Gustavsson AL, et al. Exploiting loss of heterozygosity for allele-selective colorectal cancer chemotherapy. *Nat Commun*. 2020 Mar 11;11:1308.
50. Liu H, Fu Z xue, Wang C yi, Qian J, Xing L, Liu Y wu. A meta-analysis of the relationship between NAT2 polymorphism and colorectal cancer susceptibility. *Med Kaunas Lith*. 2012;48(3):117–31.
51. Tamer L, Ercan B, Ateş NA, Değirmenci U, Unlü A, Ateş C, et al. N-acetyltransferase 2 gene polymorphism in patients with colorectal carcinoma. *Cell Biochem Funct*. 2006;24(2):131–5.
52. Wang CL, Liu ZP, Guo L. NAT2 knockdown inhibits the development of colorectal cancer and its clinical significance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 May;25(9):3460–9.
53. Kamel AM, Ebid GTA, Moussa HS. N-Acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism as a risk modifier of susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015 Aug;36(8):6341–8.
54. Zanosso CW, Emerenciano M, Faro A, Gonçalves BADA, Mansur MB, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic variability in N-acetyltransferase 2 gene determines susceptibility to childhood lymphoid or myeloid leukemia in Brazil. *Leuk Lymphoma*. 2012 Feb;53(2):323–7.
55. Vineis P. Epidemiology of cancer from exposure to arylamines. *Environ Health Perspect*. 1994 Oct;102 Suppl 6(Suppl 6):7–10.

56. Carreón T, Ruder AM, Schulte PA, Hayes RB, Rothman N, Waters M, et al. NAT2 slow acetylation and bladder cancer in workers exposed to benzidine. *Int J Cancer*. 2006 Jan 1;118(1):161–8.
57. Zhang M, Wang S, Wilffert B, Tong R, van Soolingen D, van den Hof S, et al. The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti-TB treatment: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2018 Dec;84(12):2747–60.
58. Zhang JW, Yu WJ, Sheng XM, Chang FH, Bai TY, Lv XL, et al. Association of CYP2E1 and NAT2 polymorphisms with lung cancer susceptibility among Mongolian and Han populations in the Inner Mongolian region. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(21):9203–10.
59. Klarin D, Damrauer SM, Cho K, Sun YV, Teslovich TM, Honerlaw J, et al. Genetics of blood lipids among ~300,000 multi-ethnic participants of the Million Veteran Program. *Nat Genet*. 2018 Nov;50(11):1514–23.
60. Donath MY, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T. Targeting innate immune mediators in type 1 and type 2 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2019 Dec;19(12):734–46.
61. Shenfield GM, McCann VJ, Tjokresetio R. Acetylator status and diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 1982 Jun;22(6):441–4.
62. Madácsy L, Szórády I, Sánta A, Barkai L, Vámosi I. Association of microalbuminuria with slow acetylator phenotype in type 1 diabetes mellitus. *Child Nephrol Urol*. 1992;12(4):192–6.
63. Irshaid YM, Abujbara MA, Ajlouni KM, El-Khateeb M, Jarrar YB. N-acetyltransferase-2 genotypes among Jordanian patients with diabetes mellitus. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2013 Jul;51(7):593–9.
64. Chennamsetty I, Coronado M, Contrepolis K, Keller MP, Carcamo-Orive I, Sandin J, et al. Nat1 Deficiency Is Associated with Mitochondrial Dysfunction and Exercise Intolerance in Mice. *Cell Rep*. 2016 Oct 4;17(2):527–40.
65. Camporez JP, Wang Y, Faarkrog K, Chukijrungrat N, Petersen KF, Shulman GI. Mechanism by which arylamine N-acetyltransferase 1 ablation causes insulin resistance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Dec 26;114(52):E11285–92.
66. Prasun P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Oct 1;1866(10):165838.
67. Wang L, Minchin RF, Butcher NJ. Arylamine N-acetyltransferase 1 protects against reactive oxygen species during glucose starvation: Role in the regulation of p53 stability. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193560.
68. Salazar-González R, Gómez R, Romano-Moreno S, Medellín-Garibay S, Núñez-Ruíz A, Magaña-Aquino M, et al. Expression of NAT2 in immune system cells and the relation of NAT2 gene polymorphisms in the anti-tuberculosis therapy in Mexican mestizo population. *Mol Biol Rep*. 2014 Dec;41(12):7833–43.

69. Portevin D, Via LE, Eum S, Young D. Natural killer cells are recruited during pulmonary tuberculosis and their ex vivo responses to mycobacteria vary between healthy human donors in association with KIR haplotype. *Cell Microbiol.* 2012 Nov;14(11):1734–44.
70. Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, et al. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2000 Jan;9(1):29–42.
71. Moschen AR, Wieser V, Gerner RR, Bichler A, Enrich B, Moser P, et al. Adipose tissue and liver expression of SIRT1, 3, and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity. *J Hepatol.* 2013 Dec;59(6):1315–22.
72. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004 Jul 16;305(5682):390–2.
73. Yu Q, Dong L, Li Y, Liu G. SIRT1 and HIF1 α signaling in metabolism and immune responses. *Cancer Lett.* 2018 Apr 1;418:20–6.
74. Salazar-González RA, Turiján-Espinoza E, Hein DW, Milán-Segovia RC, Uresti-Rivera EE, Portales-Pérez DP. Expression and genotype-dependent catalytic activity of N-acetyltransferase 2 (NAT2) in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by Sirtuin 1. *Biochem Pharmacol.* 2018 Oct;156:340–7.
75. Hernández-González O, Herrera-Vargas DJ, Martínez-Leija ME, Zavala-Reyes D, Portales-Pérez DP. The role of arylamine N-acetyltransferases in chronic degenerative diseases: Their possible function in the immune system. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2022 Sep;1869(9):119297.
76. Siva N. 1000 Genomes project. *Nat Biotechnol.* 2008 Mar;26(3):256.
77. Levano KS, Jaramillo-Valverde L, Tarazona DD, Sanchez C, Capristano S, Vásquez-Loarte T, et al. Allelic and genotypic frequencies of NAT2, CYP2E1, and AADAC genes in a cohort of Peruvian tuberculosis patients. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 Oct;9(10):e1764.
78. Wang PY, Xie SY, Hao Q, Zhang C, Jiang BF. NAT2 polymorphisms and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* 2012 May;16(5):589–95.
79. Walraven JM, Zang Y, Trent JO, Hein DW. Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Curr Drug Metab.* 2008 Jul;9(6):471–86.
80. Probst-Hensch NM, Haile RW, Ingles SA, Longnecker MP, Han CY, Lin BK, et al. Acetylation polymorphism and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 1995 May 15;55(10):2017–20.
81. Kerner G, Laval G, Patin E, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL, et al. Human ancient DNA analyses reveal the high burden of tuberculosis in Europeans over the last 2,000 years. *Am J Hum Genet.* 2021 Mar 4;108(3):517–24.

82. Chimusa ER, Zaitlen N, Daya M, Möller M, van Helden PD, Mulder NJ, et al. Genome-wide association study of ancestry-specific TB risk in the South African Coloured population. *Hum Mol Genet.* 2014 Feb 1;23(3):796–809.
83. Royo JL. Hardy Weinberg Equilibrium Disturbances in Case-Control Studies Lead to Non-Conclusive Results. *Cell J.* 2021 Jan;22(4):572–4.
84. Wang J, Shete S. Testing Departure from Hardy-Weinberg Proportions. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1666:83–115.
85. Suliman S, Nieto-Caballero VE, Asgari S, Lopez K, Iwany SK, Luo Y, et al. History of tuberculosis disease is associated with genetic regulatory variation in Peruvians. *MedRxiv Prepr Serv Health Sci.* 2023 Jun 27;2023.06.20.23291558.
86. Hu W, Xu K. Research progress on genetic control of host susceptibility to tuberculosis. *Zhejiang Xue Xue Bao Yi Xue Ban J Zhejiang Univ Med Sci.* 2022 Dec 25;51(6):679–90.