

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“Asociación de polimorfismos genéticos en NAT2
con el daño hepático inducido por isoniacida, en
pacientes con tuberculosis activa o latente: Estudio
piloto”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en toxicología y
diagnóstico molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

Paulina Andrea Moreno Peñaloza

**Director de Tesis: Prof. Dr. Luis Quiñones Sepúlveda
Co-director de Tesis: Prof. Dr. Nelson Varela Figueroa**

**SANTIAGO-CHILE
Noviembre 2020**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

PAULINA ANDREA MORENO PEÑALOZA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y diagnóstico molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Luis Quiñones Sepúlveda _____

Co-director de Tesis:

Dr. Nelson Varela Figueroa _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund H. _____

Dr. Mario Rivera M. _____

Dr. Mauricio Moraga V. _____

Índice General

Índice General.....	II
Índice de tablas	IV
Índice de Figuras	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumen	IX
Abstract.....	XI
1. Introducción	- 1 -
1.1. Tuberculosis (TB): incidencia, etiología y transmisión.....	- 1 -
1.2. Tratamiento farmacológico de la TB	- 3 -
1.3. Isoniacida y daño hepatotóxico durante el tratamiento de TB.....	- 5 -
1.4. Enzima NAT2	- 10 -
1.5. Farmacogenética, isoniacida y NAT2.....	- 16 -
1.6. HIPOTESIS	- 19 -
1.7. OBJETIVO GENERAL.....	- 19 -
1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 19 -
2. Metodología	- 20 -
2.1. Pacientes	- 20 -
2.1.1. Selección de voluntarios.....	- 21 -
2.1.2. Criterios de elegibilidad	- 22 -
2.1.3. Reclutamiento.....	- 22 -
2.2. Población general chilena	- 23 -
2.3. Obtención del ADN genómico (gDNA)	- 23 -
2.4. Análisis genotípico	- 24 -
2.5. Análisis estadístico	- 25 -
2.6. Aspectos éticos	- 25 -
3. Resultados	- 26 -
3.1. Frecuencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en población general chilena	- 26 -
3.2. Características generales de los pacientes reclutados	- 27 -

3.3.	Evaluación de daño hepático y cambios en niveles de GPT en pacientes reclutados - 28 -	
3.4.	Determinación de polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en el gen <i>NAT2</i> en pacientes reclutados	- 31 -
3.5.	Relación entre la presencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) del gen <i>NAT2</i> y la aparición de hepatotoxicidad.....	- 33 -
3.5.1.	Grado de hepatotoxicidad 1 o superior.....	- 33 -
3.5.2.	Aumento de los niveles de GPT basales al doble.....	- 40 -
4.	Discusión.....	- 47 -
4.1.	Frecuencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en población general chilena	- 47 -
4.2.	Evaluación de daño hepático y cambios en niveles de GPT en pacientes reclutados - 49 -	
4.4.	Relación entre la presencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) del gen <i>NAT2</i> y la aparición de hepatotoxicidad.....	- 53 -
4.4.1.	Grado de hepatotoxicidad 1 o superior.....	- 53 -
4.4.2.	Aumento de los niveles de GPT basales al doble.....	- 61 -
5.	Conclusiones	- 63 -
6.	Referencias	- 64 -
	ANEXO N°1.....	- 74 -
	ANEXO N°2.....	- 75 -

Índice de tablas

Tabla N°1: Descripción de esquema primario de tratamiento para la TB activa	- 5 -
Tabla N°2: Relación del nivel de daño hepático producido por fármaco con los niveles de transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina aumentado tantas veces respecto al LSN*- 10 -	-
Tabla N°3: SNPs, <i>Reference SNP cluster ID</i> (Rs), Alelo principal y consecuencia aminoacídica de los polimorfismos más comunes en NAT2.	- 15 -
Tabla N°4: Frecuencia de los SNP de NAT2 en diferentes poblaciones	- 16 -
Tabla N°5: Datos de los SNPs a estudiar, la secuencia contexto y el número del catálogo de la sonda TaqMan®.	- 24 -
Tabla N°6: Tamaño muestral y las frecuencias genotípicas y alélicas para los SNP en estudio en una población general chilena.....	- 26 -
Tabla N°7: Caracterización de los pacientes reclutados para este estudio	- 28 -
Tabla N°8: Parámetros de alteración de los niveles de GPT y grado de severidad del daño hepático basado en graduación LiverTox.	- 29 -
Tabla N°9: Frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para los polimorfismos rs1041983 y rs1799930 del gen NAT2, para la población total de pacientes analizados, N=37.	- 32 -
Tabla N°10: Frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para los polimorfismos rs1041983 y rs1799930 del gen NAT2, solo para aquellos pacientes de nacionalidad chilena, N=21.....	- 32 -
Tabla N°11: Análisis regresión logística univariado, de cada factor no genético con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida. .	- 34 -
Tabla N°12: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1041983, utilizando diferentes modelos de herencia, con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida.	- 35 -
Tabla N°13: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida.	- 36 -
Tabla N°14: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia codominante) y variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante)	

con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida..... - 37 -

Tabla N°15: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia recesivo), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante) con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida- 37 -

Tabla N°16: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs 1041983 (modelo de herencia dominante), variante genética rs 1799930 (modelo de herencia codominante) con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida - 38 -

Tabla N°17: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs 1041983 (modelo de herencia dominante) y el IMC con respecto a la media (24,22 (kg/m²)), con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida..... - 39 -

Tabla N°18: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs 1041983 (modelo de herencia dominante), el IMC con respecto a la media (24,24 (kg/m²)) y la edad con respecto a la media (45 años), con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida..... - 40 -

Tabla N°19: Análisis regresión logística univariado, de cada factor no genético con el aumento de GPT al doble del basal, en pacientes a los que se les administró isoniacida.- 41 -

Tabla N°20: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1041983 utilizando diferentes modelos de herencia, con el aumento de GPT al doble del basal, en pacientes a los que se les administró isoniacida - 42 -

Tabla N°21: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida..... - 42 -

Tabla N°22: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia codominante), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida..... - 43 -

Tabla N°23: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia recesivo), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con

el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida.....	- 44 -
Tabla N°24: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia dominante), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida.....	- 44 -
Tabla N°25: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia dominante) y la edad con respecto a la media (45 años), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida.	- 45 -
Tabla N°26: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia dominante), IMC, y la edad con respecto a la media (45 años), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida-	46 -
-	
Tabla N°27: Frecuencias de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en diferentes poblaciones.	- 48 -
Tabla N°28: Frecuencias de los alelos para las variantes genéticas evaluadas en la población estudiada (n=37), solo los chilenos de esta población (n=21) y la población general chilena, además de las frecuencias observadas en diferentes poblaciones	- 52 -
Tabla N°29: Alelos de NAT2 (haplotipos) que presentan el SNP C282T (rs1041983), cambio aminoacídico y fenotipo presentado	- 58 -

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de la metabolización de isoniacida.....	- 7 -
Figura 2. Estructura de la enzima NAT2.....	- 12 -
Figura 3. Esquema de las principales enzimas participantes del proceso metabólico de la isoniacida.....	- 13 -
Figura 4. Esquema del gen <i>NAT2</i> , ubicación y principales SNPs.....	- 14 -
Figura 5: Grafico del porcentaje de pacientes que presentaron niveles de hepatotoxicidad de grado 0 a 4 de acuerdo con la tabla LiverTox	- 30 -
Figura 6: Porcentaje de pacientes que presentaron un aumento de dos veces o más de GPT con respecto a su valor vs aquellos que no presentaron aumento.	- 31 -

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALT: Alanina aminotransferasa

ARN: Ácido ribonucleico

AST: Aspartato transaminasa

CESFAM: Centro de Salud Familiar

CMT: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

DILI: Daño hepático inducido por drogas (Del inglés *drug induced liver injury*)

GOT: Transaminasa glutámico-oxalacética (Del inglés glutamic-oxaloacetic transaminase)

GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica (Del inglés glutamic-pyruvic transaminase)

IMC: Índice de masa corporal

MDR: Resistencia múltiple a drogas (Del inglés *Multidrug-resistant*)

NAT2: N-acetil transferasa 2

OR: Razón de probabilidades (Del inglés *Odd Ratio*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés *Polymerase chain reaction*)

RAM: Reacción adversa a medicamentos

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Del inglés *real time polymerase chain reaction*)

SNP: Polimorfismo de nucleótido único (Del inglés *Single nucleotide polymorphism*)

SSMC: Servicio de salud metropolitano central

TB: Tuberculosis

UTR: Región no traducida (Del inglés *Untranslated Region*)

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa producida principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Actualmente, según la OMS, tiene a un tercio de la población mundial contagiada. En Chile, se estima que en el año 2015 hubo 211 personas fallecidas producto de esta infección. El tratamiento para esta enfermedad está bien documentado, dentro del mismo, uno de los fármacos más importantes es isoniacida, por ser bien tolerado, tener buena capacidad bactericida y ser de bajo costo. El régimen con este medicamento puede producir reacciones adversas, siendo la más grave la hepatotoxicidad, que puede causar la interrupción del tratamiento, e incluso en casos más severos, producir una hepatitis fulminante. Se ha determinado que la RAM hepatotóxica, puede llegar a ocurrir en un 36% de los pacientes. En la metabolización de isoniacida, la acetilación del fármaco por la enzima N-acetiltransferasa 2 (NAT2), es esencial. Ha sido descrito que existen polimorfismos en el gen de NAT2 que provocan una actividad metabólica diferencial de la enzima. Determinados polimorfismos genéticos permiten establecer tres posibles velocidades de acetilación: rápida, intermedia y lenta. El fenotipo acetilador lento, conduciría a un aumento de la aparición de hepatotoxicidad por uso de isoniacida, aunque existen estudios que refutan lo anterior y confieren la aparición de la RAM al fenotipo acetilador rápido. En poblaciones caucásicas los polimorfismos más estudiados de NAT2, que se encuentran relacionados a la reacción adversa de isoniacida, son C282T, A803G, T341C y G590A, de estos, destacan C282T y G590A por su relevancia en estudios publicados recientemente. En Chile no existen estudios que informen sobre la presencia de los polimorfismos de NAT2 y su relación con la hepatotoxicidad inducida por isoniacida. De acuerdo con estos antecedentes se propuso la siguiente hipótesis de trabajo: *La presencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) del gen codificante para la enzima NAT2 se asocia(n) con la aparición de reacciones adversas de tipo hepáticas, por el uso de isoniacida incluida en el tratamiento de pacientes con tuberculosis activa o latente, en Chile.* Para responder la hipótesis se planteó como objetivo general: Estudiar la asociación entre la presencia de los polimorfismos C282T (Rs1041983) y G590A (Rs1799930) de NAT2 y el desarrollo de hepatotoxicidad como reacción adversa a isoniacida (RAM) en pacientes con tuberculosis activa o latente. Para llevar a cabo el objetivo, se realizó un estudio epidemiológico caso-control, obteniendo un total de 37 muestras que fueron utilizadas en los

análisis y que luego se procesaron mediante sondas *TaqMan*®. Se evaluó la presencia de los polimorfismos a través de Real-Time PCR. Se encontró que en un 32,43% del total de pacientes estudiados, presentaron hepatotoxicidad. Además, dentro de los análisis, fue determinada la frecuencia de los polimorfismos en la población estudiada, observando en ella que para la variante rs1041983 la frecuencia para el alelo T es de 34% y para la variante rs1799930, la frecuencia para el alelo A es de un 11%. Por último, en los análisis estadísticos, se observa que para la variante rs1041983 existe un OR de riesgo de 7,50 para modelo de herencia dominante. Esta misma variante al ser evaluada en un modelo multivariado junto a los factores no genéticos IMC y edad, se consigue un modelo con significancia estadística y con un pseudo R^2 de 29%. Para los análisis sobre el aumento de GPT basal, no se obtuvieron resultados tan significativos como para lo anterior. Este es un primer paso para conocer qué ocurre con la hepatotoxicidad inducida por isoniacida en nuestro país, y la posible relación que variantes genéticas como rs1041983 tienen en la aparición de esta reacción adversa.

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease caused mainly by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. Currently, according to WHO, it has a third of the world's population infected. In Chile, it is estimated that in 2015 there were 211 people who died as a result of this infection. The treatment for this disease is well documented, within it, one of the most important drugs is isoniazid, as it is well tolerated, has good bactericidal capacity and is low cost. The regimen with this medicine can produce adverse reactions, the most serious being hepatotoxicity, which can cause the interruption of treatment, and even in more severe cases, produce fulminant hepatitis. It has been determined that hepatotoxic ADR can occur in 36% of patients. In the metabolization of isoniazid, acetylation of the drug by the enzyme N-acetyltransferase 2 (NAT2) is essential. It has been described that there are polymorphisms in the NAT2 gene that cause a differential metabolic activity of the enzyme. Certain genetic polymorphisms make it possible to establish three possible acetylation rates: fast, intermediate and slow. The slow acetylator phenotype would lead to an increase in the appearance of hepatotoxicity due to the use of isoniazid, although there are studies that refute the above and confer the appearance of ADR to the fast acetylator phenotype. In Caucasian populations, the most studied NAT2 polymorphisms, which are related to the adverse reaction of isoniazid, are C282T, A803G, T341C and G590A, of these, C282T and G590A stand out due to their relevance in recently published studies. In Chile there are no studies reporting the presence of NAT2 polymorphisms and their relationship with isoniazid-induced hepatotoxicity. In accordance with these antecedents, the following working hypothesis was proposed: *The presence of polymorphisms C282T (rs1041983) and G590A (rs1799930) of the gene encoding the NAT2 enzyme is associated with the appearance of hepatic-type adverse reactions, for the use of isoniazid included in the treatment of patients with active or latent tuberculosis, in Chile.* To answer the hypothesis, the general objective was: To study the association between the presence of polymorphisms C282T (Rs1041983) and G590A (Rs1799930) of NAT2 and the development of hepatotoxicity as an adverse reaction to isoniazid (ADR) in patients with active or latent tuberculosis. To carry out the objective, a case-control epidemiological study was carried out, obtaining a total of 37 samples that were used in the analyzes and which were then processed using *TaqMan*® probes. The presence of the polymorphisms was evaluated through Real-Time PCR. It was found that in 32.43%

of the total of patients studied, they presented hepatotoxicity. In addition, within the analyzes, the frequency of polymorphisms in the studied population was determined, observing in it that for the variant rs1041983 the frequency for the T allele is 34% and for the variant rs1799930, the frequency for the allele A is of 11%. Finally, in the statistical analyzes, it is observed that for the rs1041983 variant the OR was 7.50 for the dominant inheritance model. This same variant when evaluated in a multivariate model together with the non-genetic factors BMI and age, a model with statistical significance and a pseudo R² of 29% was achieved. For the analyzes on the increase in baseline GPT, results were not as significant as for the above. This is a first step to know what happens with isoniazid-induced hepatotoxicity in our country, and the possible relationship that genetic variants such as rs1041983 have in the appearance of this adverse reaction.

1. Introducción

1.1. Tuberculosis (TB): incidencia, etiología y transmisión.

La tuberculosis pulmonar es una infección respiratoria que afecta anualmente a millones de personas en el mundo, convirtiéndola en una de las 10 causas de muerte a nivel global. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, de estos, un 10% evolucionan a enfermedad. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), durante el año 2018 un estimado de 10 millones de personas (entre un rango de 9 y 11 millones) enfermaron de tuberculosis y un aproximado de 1,2 millones murieron a causa de esta, siendo VIH negativos, y más de 250 mil personas seropositivas fallecieron a causa de la infección (World Health Organization, WHO, 2019).

En Chile, la incidencia de TB el año 2017 fue de 15.6 casos por cada 100.000 habitantes, lo que corresponde a un total de 2.740 casos ese año, concentrándose en pacientes entre 25 y 64 años. Por su parte, la tasa de mortalidad en el país durante el año 2016, debido a TB, fue de 1,2 por cada 100.000 habitantes (Farga & Peña, 2019). La OMS informa en su reporte anual, que, en el año 2018, Chile presentó un aproximado de 3.400 casos de TB, con una tasa de mortalidad de 2,4 por cada 100.000 habitantes (World Health Organization, WHO, 2019). Esto es un aumento considerable, comparado con los datos obtenidos entre los años 1990 a 2005, donde se observa una declinación prolongada durante todo este período comparándolo con datos de la década del 50, en donde la mortalidad tuvo una disminución de 250 a 1,5 defunciones por cada 100 mil habitantes. Por su parte, la morbilidad también se había reducido, de 386 a 13 casos por 100 mil habitantes (Fica *et al*, 2019).

La TB es una enfermedad producida por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), este se encuentra constituido por las especies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microtii* y *Mycobacterium canetti*; siendo la *M. tuberculosis* la que ha sido aislada en la mayor cantidad de casos de tuberculosis a nivel mundial (Murray *et al*, 2016).

Los miembros del CMT son bacilos de crecimiento lento, cuyo tiempo de duplicación es de 12 a 24 horas con las condiciones adecuadas. La característica más notable de las especies pertenecientes al CMT es su estructura celular, la que les otorga una fuerte barrera impermeable a una amplia gama de compuestos químicos utilizados como desinfectantes o antisépticos y de drogas, lo que juega un factor fundamental en su virulencia, como también en el tratamiento farmacológico. *M. tuberculosis* posee una membrana externa que es similar en función a las bacterias Gram negativas, esta consiste en ácido micólico en la porción interna y glicolípidos en la externa. El espacio entre la porción interna y externa forma una sección periplasmática (Delogu *et al*, 2013; Murray *et al*, 2016).

La vía de transmisión predominante de la enfermedad es la aérea, un portador puede toser y liberar aerosoles con los bacilos que posteriormente pueden ser inhalados por un sujeto sano. Al entrar por las vías respiratorias llegan hasta los alveolos pulmonares, lugar donde los macrófagos alveolares los fagocitan y detienen su propagación. Puede ocurrir que pese a ser fagocitados, los bacilos sean capaces de sobrevivir y comenzar su replicación dentro de los macrófagos, difundiendo así a células epiteliales y endoteliales. Es posible que, durante estas primeras etapas de la infección, la bacteria pueda migrar hacia otros órganos del cuerpo mediante las vías linfáticas o hematógenas, si la infección progresa en otros órganos, se conoce como tuberculosis extrapulmonar (Pai *et al*, 2016).

En la mayoría de los casos, después de que la respuesta inmune adaptativa ocurre, la migración de varios tipos de células inmunes hacia el sitio de infección forma una estructura llamada granuloma, que consiste en un infiltrado celular. El granuloma es luego cubierto por componentes fibróticos y calcificado, mientras dentro de esta estructura se mantienen los bacilos encapsulados permitiendo evadir la respuesta inmune. Este proceso se conoce como infección latente. Esta situación puede mantenerse por varios años, y por razones aún desconocidas, la bacteria puede salir de este granuloma y comenzar la infección, produciéndose así la tuberculosis activa (Lozano, 2002; Philips & Ernst, 2012; Pai *et al*, 2016).

La TB pulmonar presenta síntomas tales como: tos productiva (la que a veces puede contener sangre en el esputo), fiebre, sudores nocturnos, debilidad y pérdida de peso (Pai *et al*, 2016). Su diagnóstico se realiza mediante diversos exámenes y técnicas, como radiografías, baciloscopia, cultivo y test de la tuberculina (Mitchison, 2005; Herrera *et al*, 2015).

1.2. Tratamiento farmacológico de la TB

Para el tratamiento de la TB, se busca erradicar al microorganismo totalmente, lo que puede ser complejo debido a que la bacteria presenta distintas actividades metabólicas durante su desarrollo. *M. tuberculosis* es capaz de presentarse dentro del organismo del paciente en cuatro estados metabólicos: 1) poblaciones metabólicamente activas, se encuentran en crecimiento continuo, en mayor proporción y son responsables de la infectividad, se eliminan con fármacos bactericidas; 2) poblaciones en fase de inhibición ácida, las que presentan una baja actividad metabólica por lo que puede ser difícil su eliminación y se ocupan para ello fármacos bacteriostáticos; 3) poblaciones en fase de multiplicación esporádica, las que presentan un corto periodo de actividad metabólica para luego presentar largos periodos de inactividad; 4) poblaciones totalmente durmientes pero con viabilidad conservada, las que no presentan actividad metabólica y son las mismas defensas del huésped quienes se encargan de ellas. Sumado a esto, es necesario también tener en consideración la posible generación de resistencia que puede presentarse frente al mismo tratamiento farmacológico. Para evitar la aparición de cepas resistentes, existe una terapia con asociación de fármacos bactericidas y esterilizantes, de este modo, si una bacteria presenta resistencia a una de las drogas, podrá ser eliminado por la otra (Mitchison, 2005; Connolly *et al*, 2007; Herrera *et al*, 2015).

La finalidad del tratamiento es lograr la erradicación del microorganismo en el menor tiempo posible, sin recaídas, que el paciente se recupere completamente y prevenir la aparición de resistencia a los fármacos antituberculosos (Connolly *et al*, 2007; Herrera *et al*, 2015; Pai *et al*, 2016). Con el fin de conseguir lo anteriormente mencionado, el tratamiento consta de dos fases. La fase inicial o bactericida, busca eliminar los bacilos de las poblaciones metabólicamente activas (población extracelular), mientras que la segunda fase, conocida como de continuación o esterilizante, tiene como objetivo eliminar a los bacilos de lento

crecimiento (población intracelular) (Connolly *et al*, 2007; Herrera *et al*, 2015; Pai *et al*, 2016; Huaman & Sterling, 2019).

El esquema de tratamiento consta de fármacos de primera y segunda línea, siendo los primeros los más utilizados por ser mejor tolerados, menos tóxicos y más baratos que los segundos. Entre estos se tiene a la isoniacida como el más utilizado, seguido de rifampicina, pirazinamida y etambutol. Para el caso de pacientes con TB latente, el tratamiento solo se realiza con isoniacida por una cantidad de tiempo determinada. Además, para garantizar el éxito del tratamiento, las dosis de los fármacos se deben administrar con supervisión de personal de salud, durante todo el tratamiento, tanto en pacientes ambulatorios como hospitalizados (Connolly *et al*, 2007; Herrera *et al*, 2015; Huaman & Sterling, 2019; Zha & Nahid, 2019).

El tratamiento en Chile se encuentra bien documentado y programado, utilizando como fármacos de primera línea a los cuatro mencionados anteriormente (Herrera *et al*, 2015). La isoniacida es un fármaco bactericida, cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de la síntesis de ácidos micólicos presentes en la pared bacteriana (Vilchèze *et al*, 2006). La rifampicina es un fármaco bactericida que inhibe la ARN polimerasa de la bacteria (Wehrli *et al*, 1968). Por su parte, la pirazinamida es un fármaco bacteriostático (también puede actuar como bactericida), que requiere del pH ácido del ambiente intracelular de los macrófagos, aunque su mecanismo hoy en día no se tiene muy claro, se cree que alteraría el potencial de membrana, afectando varias vías metabólicas, incluyendo la de ácidos grasos y su transporte de membrana, afectando su permeabilidad (Boshoff *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003). Por último, el etambutol es un fármaco bacteriostático, que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular de los bacilos mediante la inhibición de la biosíntesis de arabinogalactano y lipoarabinomanano (Deng *et al*, 1995).

El esquema primario de tratamiento a nivel nacional consta de una fase diaria con los 4 fármacos descritos, los que se administran al paciente en presencia del encargado de salud de lunes a viernes por un total de 50 dosis, las que corresponden a 10 semanas. Terminada esta fase, comienza la de continuación, la que cuenta con la presencia solamente de isoniacida y

rifampicina, con una administración lunes, miércoles y viernes por un total de 48 dosis, lo que equivale a 16 semanas. Se debe mencionar que, para el tratamiento de la tuberculosis latente, el paciente recibe una dosis de isoniacida de 300mg de lunes a domingo por una duración de 9 meses, para estos casos, el paciente no debe ser supervisado directamente en su ingesta, y solamente visita su centro asistencial cada 15 días para el retiro de sus dosis semanales y control (Herrera *et al*, 2015; Zha & Nahid, 2019). Este esquema puede verse alterado de ser necesario si es que el paciente presenta resistencia a algunos de los fármacos utilizados. El tratamiento explicado en tiempo y dosis es posible visualizarlo de manera más simple en la tabla N°1.

Tabla N°1: Descripción de esquema primario de tratamiento para la TB activa

Fármaco	Fase Diaria (mg): 50 dosis	Fase de Continuación (mg): 40 dosis
Isoniacida	300	600
Rifampicina	600	600
Pirazinamida	1500	
Etambutol	800	

1.3. Isoniacida y daño hepatotóxico durante el tratamiento de TB

La isoniacida es un antibiótico utilizado principalmente como fármaco de primera línea para tratar la tuberculosis. Fue sintetizado por primera vez a principios del siglo 20, aunque su capacidad bactericida contra *M. tuberculosis* no fue descrita hasta la década del 50. Sus presentaciones son en forma de comprimidos, jarabes y la forma inyectable. En general es bien tolerado, de bajo costo y es posible encontrarlo ampliamente alrededor del mundo (Pandey *et al*, 2014).

Una vez administrado el comprimido, la isoniacida es absorbida rápidamente durante su trayecto por el intestino delgado, logrando alcanzar niveles séricos máximos 1 a 2 horas post-ingesta. Además, la absorción puede verse alterada con la ingesta de alimentos o azúcares, se ha reportado que la absorción del fármaco es casi de un 100% en aquellos pacientes con un ayuno aproximado de 1 a 2 horas, mientras que ocurre una disminución notoria de la absorción al ingerir el medicamento con el estómago lleno. Esto puede deberse a la

conversión de la isoniacida a especies hidrazonas, lo que hace que el fármaco presente menor biodisponibilidad (Saktiawati *et al*, 2016; Wang *et al*, 2016).

El fármaco presenta una alta permeabilidad principalmente en el intestino, se ha estudiado que en los tres segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleo) en ratas, presenta una mayor permeabilidad. Una vez absorbido, la isoniacida es ampliamente distribuida en todos los fluidos y tejidos, esto va de acuerdo con su volumen de distribución (0,6 L/kg), presentándose una acumulación notoria en el hígado. Se ha descrito que el modelo farmacológico de la isoniacida sigue una cinética de primer orden (Klein *et al*, 2016). En el hígado, el fármaco es metabolizado mediante acetilación para producir metabolitos inactivos. Su excreción es en gran medida (aproximadamente 80%) a través de la orina en forma de isoniacida o sus metabolitos. La cantidad restante es eliminada del cuerpo por las heces, saliva e incluso esputo (Donald & Schaaf, 2011; Klein *et al*, 2016; Fernandes *et al*, 2017; Vademécum, 2020).

La síntesis de la isoniacida es a partir del ácido nicotínico, es un compuesto orgánico y su mayor característica es que posee solo un anillo piridínico. El fármaco es una pro-droga, y debe ser metabolizado antes de poder ejercer su acción sobre su blanco. Su mecanismo de acción tiene como objetivo interrumpir la biosíntesis del ácido micólico, molécula fundamental de la membrana micobacteriana. Esto lo consigue ya que es capaz de inhibir a la enzima enoil-ACP-reductasa (Judge *et al*, 2012; Fernandes *et al*, 2017). La pro-droga es metabolizada dentro de la bacteria *M. tuberculosis* mediante KatG, una enzima catalasa peroxidasa, para convertirse en el compuesto activo y ejercer su acción bactericida. A nivel hepático, la isoniacida pasa por dos vías metabólicas importantes: (1) Acetilación para formar N-acetil isoniacida catalizada a través de la enzima N-acetiltransferasa 2 (NAT2), lo que ocurre con un rendimiento del 50 a 90% del total del fármaco e, (2) hidrólisis para producir ácido isonicotínico e hidracina, gracias a la acción enzimática de la amidasa. La N-acetil isoniacida puede ser hidrolizada para formar ácido isonicotínico y acetilhidracina, esta última también puede ser producida a partir de la acetilación de la hidracina mediante NAT2. Ambos compuestos, acetilhidracina e hidracina, pueden ser oxidados a metabolitos reactivos (Fig.1) (World Health Organization, 1992; Donald & Schaaf, 2011; Saktiawati *et al*, 2016). Existen

otras vías metabólicas alternas a las principales ya mencionadas, como la conjugación de isoniácida con varios metabolitos, como también, la capacidad del fármaco de irrumpir la homeostasis de varios metabolitos (Klein *et al*, 2016).

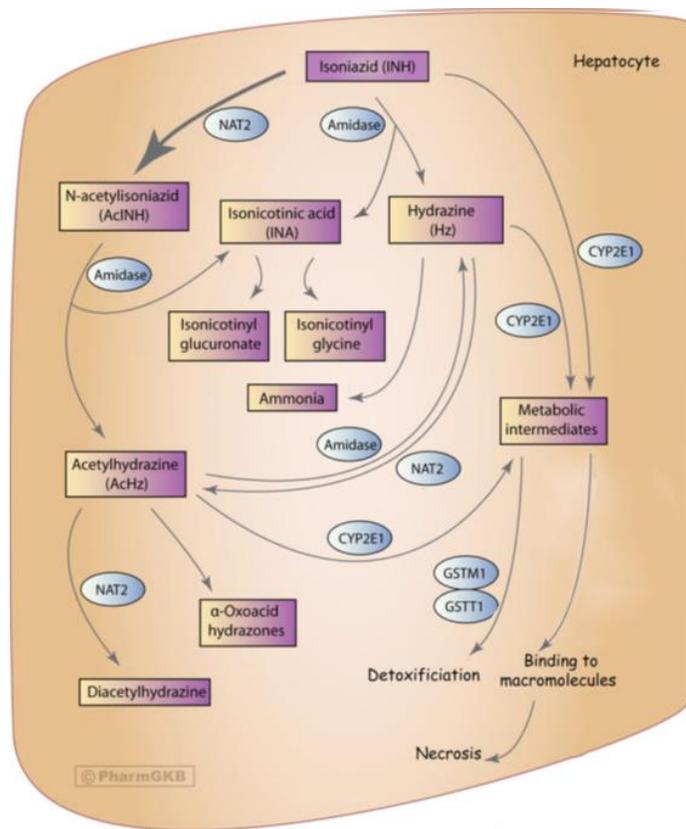


Figura 1. Esquema de la metabolización de isoniácida en un hepatocito. Imagen modificada de: Klein, D. J., Boukouvala S., McDonagh E. M., Shuldiner S. R., Laurieri N., Thorn C. F., *et al.* PharmGKB Summary: Isoniazid Pathway, Pharmacokinetics. Pharmacogenet Genomics. 2016; 26(9): 436:444. 6

La isoniácida, como también la acetil-isoniácida y la hidracina, pueden ser oxidadas por el citocromo P450 2E1 (CYP2E1), generando intermediarios con capacidad hepatotóxica. Su toxicidad es debido a que pueden ser deshidratados a compuestos capaces de unirse covalentemente a macromoléculas produciendo muerte celular (necrosis hepática). El daño generado por estos compuestos metabolitos hepatotóxicos es susceptible a neutralización gracias a la acción de la enzima glutatión S-transferasa (GST), capaz de conjugar estos metabolitos con glutatión para que sean eliminados y con ello, evitar el daño de las células hepáticas (Donald & Shaaf, 2011; Klein *et al*, 2016;).

La isoniacida, así como cualquier otro fármaco, puede provocar reacciones adversas a medicamentos (RAM), lo que puede acentuarse aún más debido a la mayor duración del tratamiento y de las dosis aplicadas. Entre estas reacciones adversas destacan la reacción de hipersensibilidad general o cutánea, neuropatía periférica y hepatotoxicidad (World Health Organization, 1992). Se considera a esta última la más grave, ya que puede llevar a la suspensión del tratamiento en caso de evolucionar a hepatitis, llegando en los casos más extremos a la muerte del paciente debido a una hepatitis fulminante (Adhvaryu *et al*, 2008). Algunos autores señalan que la incidencia de hepatotoxicidad inducida por drogas antituberculosas llega al 30% (Saukkonen *et al*, 2006; Marra *et al*, 2007; Guaoua *et al*, 2014). Otros estudios, reportan que el 10 a 20% de los pacientes puede presentar daño hepático inducido por fármacos antituberculosos (Santos *et al*, 2013; Feng *et al*, 2014). El 1% puede progresar a hepatitis (Huang, 2014). La tasa de mortalidad en estos pacientes es de un 10% (World Health Organization, WHO, 2012). En Chile, hoy en día, no tenemos datos sobre qué tan frecuente ocurre la hepatotoxicidad en pacientes con tratamiento antituberculoso. Otro factor para considerar es el abandono del tratamiento, lo que significa un posible foco de contagio para la salud de la población, además de generar resistencia al tratamiento de primera línea. Estos casos llevan a tomar un tratamiento más agresivo, largo y con aún más efectos adversos (Zha & Nahid, 2019).

Cuando se habla de que se produce hepatotoxicidad por un fármaco se denomina como “daño hepático inducido por drogas” o DILI por sus siglas en inglés (*Drug Induced Liver Injury*), para la isoniacida existen varios estudios que explican que esta droga puede producir hepatotoxicidad. Con respecto a la hepatotoxicidad producida por isoniacida, esta se puede presentar dentro de las semanas 1 a 25 de tratamiento (Saukkonen *et al*, 2006). Se cree que el daño hepático es producido por acetilhidracina e hidracina, aunque recientemente se ha propuesto que además de estos dos metabolitos, existe un metabolito producido por la bioactivación de la isoniacida (Metushi *et al*, 2016).

Dentro del daño hepático, existen varias categorizaciones que dan cuenta del nivel de daño, basadas en los niveles de enzimas hepáticas en suero, tal como las transaminasas, dentro de las que más se estudian en el paciente son la transaminasa glutámico pirúvica o alanina

transaminasa (conocida como GPT o ALT) y la transaminasa glutámico-oxalacética o aspartato transaminasa (AST o GOT), aunque se recomienda revisar los niveles de GPT de cada paciente en tratamiento con isoniacida, debido a que el GOT puede dar cuenta de daño de otros tejidos, como el corazón, mientras que la GPT es específica para el hígado (Saukkonen *et al*, 2016).

Para varios estudios que buscan relacionar la aparición de hepatotoxicidad inducida por isoniacida, se utilizan diferentes rangos de niveles de transaminasas, por ejemplo, la Sociedad Torácica Americana, detalla que se considera hepatotoxicidad inducida por isoniacida, si el paciente presenta una elevación de sus niveles de GPT de 3 veces con respecto al límite superior normal (LSN) con síntomas (tales como náuseas, vómitos y dolor abdominal) o si los niveles de GPT son superiores a 5 veces el LSN (Saukkonen *et al*, 2006). Además, se conoce que de por sí la isoniacida lleva a un aumento de los niveles de GPT basales, que no suele ser de gravedad y con el paso del tiempo vuelve a sus valores normales (Aguayo & Rodríguez, 2011). Estudios que muestren los aumentos de GPT de cada paciente con respecto a su valor basal no existen propiamente tal a día de hoy, por lo que sería de interés evaluarlo.

En los últimos años, se han propuesto diferentes tablas que dan cuenta del nivel de daño hepático relacionado con los niveles de GPT con respecto al LSN, una de ellas que cabe destacar y que fue utilizada en un estudio de 2017 (Chan *et al*, 2017) que analiza el nivel del daño con la ingesta de isoniacida es la publicada por LiverTox y da cuenta de 4 niveles de gravedad, con respecto al número de veces que se encuentran elevados los niveles de las transaminasas con respecto al LSN (Tabla 2) (LiverTox, 2012).

Tabla N°2: Relación del nivel de daño hepático producido por fármaco con los niveles de transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina aumentado tantas veces respecto al LSN*

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
GPT	<1,25	1,25 – 2,5	>2,5 – 5,0	>5,0 – 10	>10
GOT	<1,25	1,25 – 2,5	>2,5 – 5,0	>5,0 – 10	>10
Fosfatasa alcalina	<1,25	1,25 – 2,5	>2,5 – 5,0	>5,0 – 10	>10
GGT	<1,25	1,25 – 2,5	>2,5 – 5,0	>5,0 – 10	>10
Bilirrubina	Normal	>1,0 – 1,5	>1,5 – 2,5	>2,5 - 5	>5

Tabla obtenida desde: LiverTox, NIH (<http://livertox.nlm.nih.gov/Severity.html>). *LSN: Límite Superior Normal

Existen diferentes factores de riesgo que están relacionados a la aparición de hepatotoxicidad en pacientes tratados con isoniacida, entre estos tenemos: (1) la edad, mientras mayor el paciente, su riesgo de desarrollar hepatotoxicidad aumenta; (2) sexo, estudios han mostrado mayor susceptibilidad en mujeres que en hombres; (3) estatus nutricional; (4) consumo de alcohol y (5) la presencia de una infección concomitante. Además de estos factores adquiridos, estudios internacionales han demostrado que existe una susceptibilidad genética del paciente, explicada principalmente por la presencia de polimorfismos en los genes codificantes para las enzimas metabolizadoras del fármaco, las que estarían íntimamente relacionadas con la mayor prevalencia en la ocurrencia de la hepatotoxicidad (Ramappa & Aithal, 2013; Xiang *et al*, 2014).

1.4. Enzima NAT2

La enzima N-acetiltransferasa arilamina hepática 2 (NAT2) es una enzima biotransformadora de fase dos, encargada de acetilar varios xenobióticos y drogas como dapsona, hidralazina, nitrazepam, procaína amida, sulfadmisina y sulfapirina (Guio *et al*, 2015; Klein *et al*, 2016). La enzima presenta otra isoforma, NAT1, que es posible encontrar en casi todos los tejidos humanos. Por su parte, NAT2 principalmente se encuentra en el hígado e intestino (Husain *et al*, 2007), además, presentan distinta

especificidad a sustrato (Liu *et al*, 2007). Ambas comparten un 81% de secuencia nucleotídica y tienen una longitud de 290 aminoácidos (Rajasekaran *et al*, 2011).

Con respecto a la estructura de las NATs humanas, el dominio N-terminal consiste en cinco hélices alfa ($\alpha 1 - \alpha 5$) y una hebra beta corta entre las hélices 2 y 3. El segundo dominio consiste en 10 hebras beta ($\beta 2 - \beta 11$) y dos hélices alfa cortas ($\alpha 6$ y $\alpha 7$). Estos dominios se unen mediante un inter-dominio ($\alpha 8 - \alpha 10$ y $\beta 12$) al tercer dominio, el que tiene 3 hebras beta antiparalelas ($\beta 13 - \beta 15$) y una hélice alfa ($\alpha 11$), esta hélice precede al dominio C-Terminal, el que se encuentra inserto en la proteína (Rajasekaran *et al*, 2011; Zhou *et al*, 2013).

El sitio catalítico de la enzima consiste en una tríada compuesta de los residuos Cisteína, Histidina y Ácido aspártico (Cys⁶⁸-His¹⁰⁷-Asp¹²²), el dominio C-terminal queda dentro de la proteína, muy cerca de este sitio catalítico. Por otra parte, el cofactor de la proteína, la Coenzima A (CoA), se une a la proteína en una hendidura que se encuentra entre el interdominio y el segundo dominio (Zhou *et al*, 2013).

El mecanismo de acción de la enzima NAT2 es denominado como Ping Pong Bi Bi, el que consiste en 2 pasos secuenciales, primero el grupo acetyl del CoA es removido, formando un intermediario acetyl, posteriormente el sustrato es acetylado y CoA es liberado (Wang *et al* 2004; Zhou *et al*, 2013).

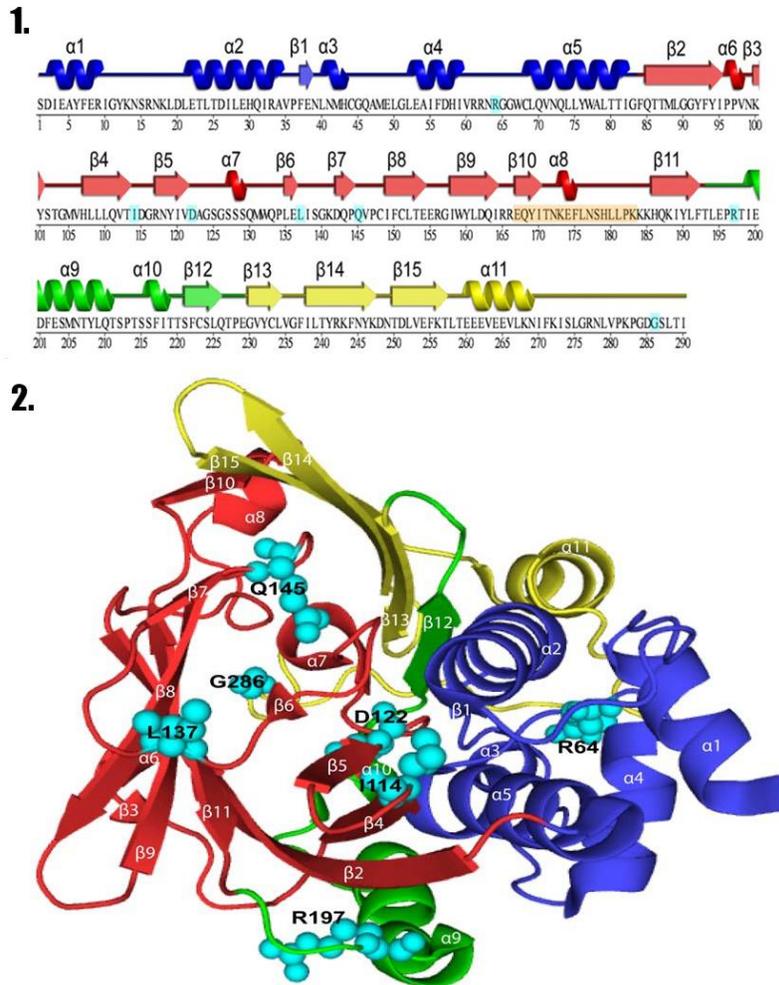


Figura 2. Estructura de la enzima NAT2. (1) Estructura secundaria de la enzima NAT2 humana, con cada dominio diferenciados por color: En azul el primer dominio, rojo el segundo, verde el tercero y el cuarto dominio en amarillo. (2) Estructura terciaria de la enzima NAT2, los polimorfismos descritos para la proteína se observan en color calipso. Imagen modificada de: *Rajasekaran, M., Abirami, S., & Chen, C. Effects of single nucleotide polymorphisms on human N-acetyltransferase 2 structure and dynamics by molecular dynamics simulation. PloS one, 2011, 6(9), e25801*

Durante la administración del esquema primario de tratamiento antituberculoso, la enzima NAT2 está encargada de acetilar a la isoniacida produciendo acetil-isoniacida, la que luego es hidrolizada a acetil hidracina. La hidracina puede ser oxidada a varios intermediarios metabólicos a través de la enzima CYP2E1 que tienen capacidad hepatotóxica, o puede ser nuevamente acetilada por NAT2 a un compuesto no tóxico, la diacetilhidracina (Fig.

3 (Donald & Schaaf, 2011; Ramappa & Aithal, 2013; Wang *et al*, 2016; Fernandes *et al*, 2017).

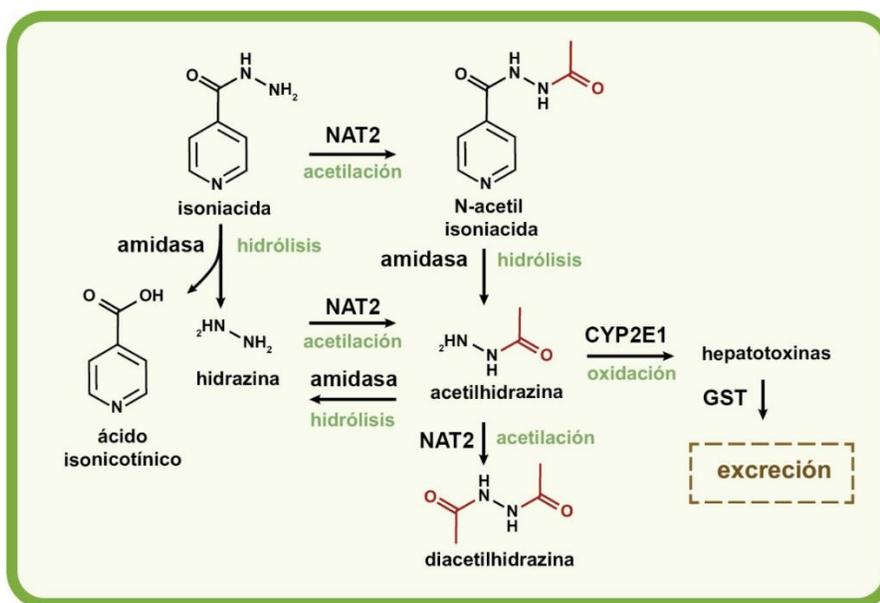


Figura 3. Esquema de las principales reacciones participantes de la metabolización de la isoniacida en hepatocito.

NAT2 está codificada por el gen *NAT2*, junto al gen *NAT1* y el pseudogen pNAT que se encuentran en tres *loci* genéticos. Estos genes fueron identificados por primera vez en el año 1989 por Grant *et al.*, y se encuentran localizados en el cromosoma 8, entre 170 y 360 Kb en 8p22 (Fig. 3) (Butcher *et al*, 2002). Los genes *NAT1* y *NAT2* consisten en 873 pares de bases. La proteína NAT2 es transcrita desde la secuencia del exón 2 y posee un exón no codificante en el 5'UTR (Untranslated Region) (Butcher *et al*, 2002; Boukouvala & Sim, 2005). Varios estudios genético-familiares, dan cuenta que la variabilidad del gen está directamente relacionada con la aparición de diferentes fenotipos de acetilación (Butcher *et al*, 2002).

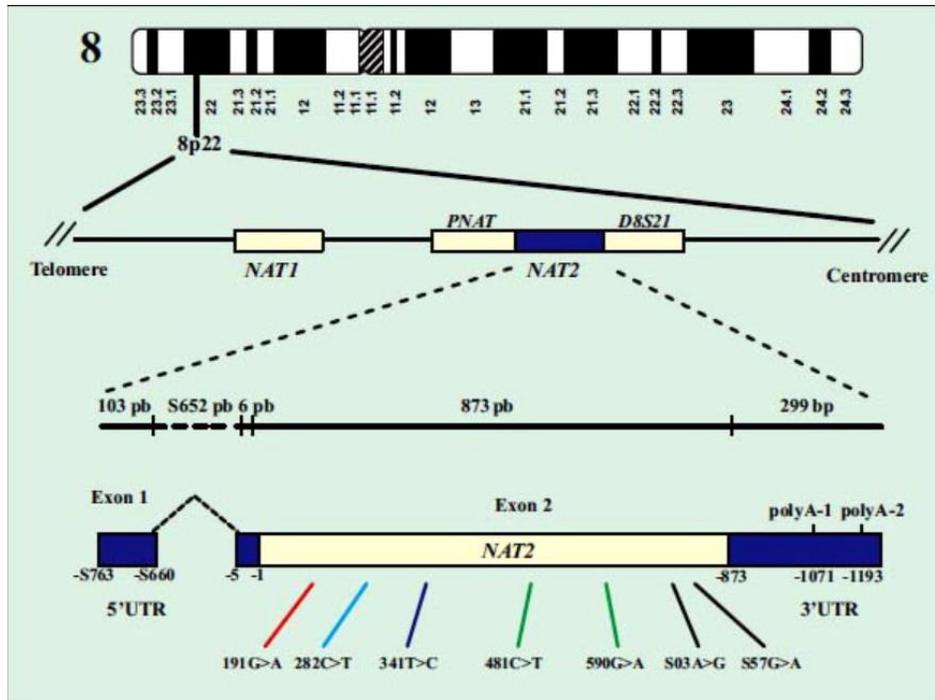


Figura 4. Esquema del gen NAT2, ubicación y SNPs más estudiados (Single Nucleotide Polymorphism): G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G y G857A. Imagen de: Teixeira, L. D. F., Quinhones Pires Lopes, M., Suffys, P. N. & Santos, A. R. *Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art. Tuberc. - Curr. Issues Diagnosis Manag.* 2013. 105–126.

La enzima NAT2 es polimórfica, lo que se traduce en una actividad metabólica diferenciada dependiendo de el o los polimorfismos genéticos presentes, alterando así la concentración de la enzima y, por ende, su actividad. Dentro de las diferencias relacionadas a su actividad metabólica, en los seres humanos se han descrito 3 fenotipos metabolizadores: lentos, intermedios y los rápidos (Ramappa & Aithal, 2013; (Teixeira *et al*, 2013). El alelo *wild type* denominado NAT2*4, se considera como responsable de un fenotipo de metabolizador rápido, aunque denominarlo de este modo puede estar errado, ya que en diversos estudios se ha encontrado que el alelo NAT2*4 no es el más común dentro de toda la población (Hein *et al*, 2000). En base a lo expuesto, se ha encontrado 88 variantes distintas o haplotipos dependiendo de la combinación de hasta 4 SNPs (por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*) presentes en la región codificante de NAT2 (McDonagh *et al*, 2014). Los SNP consisten en un cambio en una sola base nucleotídica y ocurren con una frecuencia igual o mayor al 1% en la población (Pirmohamed, 2001)

En aquellos pacientes que poseen ambos alelos *wild type*, es posible administrar las dosis estándar del fármaco, en este caso, isoniacida. Los acetiladores intermedios, son aquellos que poseen un alelo activo y otro inactivo de NAT2 (heterocigoto), y son quienes pueden requerir dosis menores del fármaco para obtener una respuesta favorable a este sin presentar reacciones adversas importantes. Mientras que aquellos que no poseen alelos con el gen *wild type*, presentarían un fenotipo de metabolizador lento (Doll *et al*, 2017).

Los SNPs más relevantes y frecuentes son siete, se encuentran en la región codificante del gen y están designados como G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G y G857A. De estos, los polimorfismos más estudiados son aquellos que están en las posiciones 341, 590 y 857, los que corresponden a NAT2*5, NAT2*6 y NAT2*7, respectivamente. Estos alelos dan cuenta del fenotipo acetilador lento. Además de estos tres alelos, también existe un cuarto, reportado como otro alelo asociado a fenotipo acetilador lento, el cual es G191A y se refiere al alelo NAT2*14 (Roy *et al*, 2008). Por su parte, aquellos que presentan los polimorfismos C282T, C481T y A803G que se asocian a los alelos NAT2*13, NAT2*11 y NAT2*12 respectivamente, se relacionan a aquellos acetiladores rápidos (Tabla N°3) (García-Martín, 2008; Ramachandran & Swaminathan, 2012). Si bien la presencia de un solo alelo da cuenta de cierto fenotipo, la manera en que se presentan juntos da como resultado distintos haplotipos con distintos fenotipos metabolizadores entre los tres mencionados (Butcher *et al*, 2002).

Tabla N°3: SNPs, Reference SNP cluster ID (Rs), Alelo principal y consecuencia aminoacídica de los polimorfismos más comunes en NAT2.

SNP	Número Rs	Alelo Principal Asociado	Cambio aminoacídico
G191A	Rs1801279	NAT2*14	Arg64Gln
C282T	Rs1041983	NAT2*13	Tyr94Tyr*
T341C	Rs1801280	NAT2*5	Ile114Thr
C481T	Rs1799929	NAT2*11	Leu161Leu*
G590A	Rs1799930	NAT2*6	Arg197Gln
A803G	Rs1208	NAT2*12	Arg268Lys
G857A	Rs1799931	NAT2*7	Gly286Glu

*: Mutación sinónima. Datos pertenecientes a 1000 genomas y obtenidos mediante NCBI:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=NAT2>

Los polimorfismos codificados en las bases nucleotídicas que se enumeran en la Tabla 3 generan cambios en los aminoácidos de la proteína que alteran su estructura terciaria. Esto puede llevar a la reducción de actividad y de los niveles de proteína por falta de estabilidad, lo que la lleva a degradarse en mayores cantidades. Por otra parte, aquellos polimorfismos que ocasionan un fenotipo de acetilador rápido, no generan consecuencias en el cambio aminoacídico, o bien, provocan una mayor estabilidad en la proteína (Walraven *et al*, 2008; Hein, 2009; Rajasekaran *et al*, 2011). La presencia de los diferentes SNPs que producen estos distintos fenotipos, es fácilmente determinable mediante procedimientos genotípicos como PCR-RFLP, sondas *TaqMan*®, PCR alelo específico o secuenciación directa (Ramappa & Aithal, 2013; Teixeira *et al*, 2013).

Estos polimorfismos han podido ser estudiados en diversas partes del mundo, pero aún en países como el nuestro, se desconoce la frecuencia de estos en la población, la Tabla N°4 resume las frecuencias de los SNP más importantes en diferentes poblaciones mundiales.

Tabla N°4: Frecuencia de los SNP de NAT2 en diferentes poblaciones

SNP	Rs	Africa	Asia-Pacífico	Europa	Sud-asia	America
G191A	1801279	(A)0,10	(A)0,00	(A)0,001	(A)0,00	(A)0,003
C282T	1041983	(T)0,46	(T)0,43	(T)0,30	(T)0,42	(T)0,29
T341C	1801280	(C)0,29	(C)0,03	(C)0,44	(C)0,34	(C)0,36
C481T	1799929	(T)0,23	(T)0,03	(T)0,43	(T)0,32	(T)0,34
G590A	1799930	(A)0,23	(A)0,25	(A)0,28	(A)0,36	(A)0,17
A803G	1208	(A)0,60	(A)0,96	(A)0,56	(A)0,63	(A)0,62
G857A	1799931	(A)0,02	(A)0,17	(A)0,02	(A)0,06	(A)0,11

*Entre paréntesis se encuentra el alelo al que corresponde esa frecuencia. Datos pertenecientes a 1000 genomas y obtenidos mediante NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=NAT2>

1.5. Farmacogenética, isoniacida y NAT2

La farmacogenética es el estudio de la variabilidad en la respuesta a los fármacos debido a la herencia genética. La noción de la variabilidad genética sobre la respuesta a ciertos fármacos o xenobióticos viene de tiempos tan antiguos como es la época de Pitágoras, quien notó que había ciertos sujetos que podían tolerar la ingesta de habas, mientras otros no lograban

tolerarlo. Si bien, existen varios marcadores farmacogenéticos, los que actualmente son de mayor interés, son los SNPs (Pirmohamed, 2001; Al-Koofee & Mubarak, 2019).

Con respecto a NAT2 y su metabolización de la isoniacida con consecuente producción de metabolitos hepatotóxicos, existen estudios que se contradicen sobre qué fenotipo es el más susceptible a generar hepatotoxicidad. Por una parte, se ha propuesto que los acetiladores rápidos de isoniacida tienen mayor riesgo de desarrollar hepatotoxicidad que aquellos que presentan fenotipo de acetilador lento. Esto es debido a que aquellos que son metabolizadores rápidos producen mayores cantidades de acetyl hidracina, siendo esto apoyado por varios estudios que determinaron que aquellos pacientes que presentaban este fenotipo presentaron o fueron susceptibles a presentar problemas al hígado (Mitchell *et al*, 1975; Mitchell *et al*, 1976; Yamamoto *et al*, 1986). A su vez, estudios recientes han reportado que pacientes con un fenotipo de acetilador lento pueden llegar a presentar hepatotoxicidad, encontrándose niveles elevados de acetyl hidracina, contradiciendo la evidencia antes presentada. Se cree que, si bien, la acetilación de isoniacida es lenta en estos pacientes, también lo es la acetilación de acetyl hidracina, lo que llevaría a una acumulación de este compuesto antes de que pudiera pasar por procesos metabólicos que permitirían su eliminación (Walker *et al*, 2009; Teixeira *et al*, 2011; Gupta *et al*, 2013; Ramappa & Aithal, 2013).

Los estudios que permiten evaluar la diversidad genética son importantes, debido a que es posible identificar polimorfismos característicos para cada población. Si bien existen estudios de polimorfismos en NAT2, estos no se han llevado a cabo en poblaciones que posean las características genéticas de la población local. Las características genéticas que posee la población chilena son sumamente heterogéneas de norte a sur, teniendo una estructura genética con componentes amerindios, caucásicos y de los diversos pueblos indígenas, que habitaron partes muy específicas del territorio, tales como los diaguitas, aimaras, mapuches, etc. (Eyheramendy *et al*, 2015). Este no es el caso de los grupos analizados, como lo son los surcoreanos, etíopes, chinos, sudafricanos, japoneses, indios y marroquíes, donde se encontraron diferencias claras entre cada población estudiada (Lee *et al*, 2002; Djordjevic *et al*, 2011; Khan *et al*, 2013; Zabost *et al*, 2013; Chan *et al*, 2017; Aklillu *et al*, 2018).

Los polimorfismos de NAT2 para acetiladores lentos se encuentran principalmente en poblaciones caucásicas e indias, mientras que su frecuencia se encuentra disminuida en la población japonesa y china (Lee *et al*, 2002; Roy *et al*, 2008; Djordjevic *et al*, 2011; Lv *et al*, 2012; Ramachandran & Swaminathan, 2012; Teixeira *et al*, 2013). Además, se ha encontrado que la frecuencia de los polimorfismos de metabolizador lento también es mucho más baja que la de los asiáticos en la población europea (Perwitasari *et al*, 2015). Otro estudio concluye que, en población caucásica y africana, la frecuencia de acetiladores lentos es de entre un 40 a 70%, mientras que en poblaciones asiáticas (tales como coreanos, japoneses, chinos y tailandeses), la frecuencia se encuentra en un rango de entre 10 a 30% (Meyer & Zanger, 1997). Dentro de lo ya mencionado, es que se ha encontrado que los polimorfismos más comunes dentro de la población caucásica y que además han sido estudiados en investigaciones de nivel 2A, con relación a los efectos adversos producidos por isoniacida son: C282T (Rs1041983), A803G (Rs1208), T341C (Rs1801280) y G590A (Rs1799930). Si bien también se encuentra como polimorfismo común en población caucásica el C481T, este se ha relacionado con investigaciones de nivel 3A con respecto a RAM producida por isoniacida (PharmGKB).

Entre los estudios que relacionan tipo de acetilador y riesgo de hepatotoxicidad por isoniacida, Chan *et al.*, relaciona los SNP C282T, A803G, T341C y G509A, en población singapurense, que da cuenta que los SNPs más relevantes son el C282T (Rs1041983) y el G590A (Rs1799930), siendo el primero enormemente relevante, además de que en varios estudios no aparece de manera tan común, por lo que sería sumamente interesante observar la relación en la población local (Chan *et al*, 2017).

Por lo antes mencionado, se destaca la importancia de estudiar qué es lo que ocurre con la población chilena, ya que estudios sobre este tema en el país no existen. Conocer los distintos polimorfismos que se presentan en esta población, su relación con la aparición de hepatotoxicidad inducida por isoniacida, dando cuenta de que fenotipo es el más común, y que efecto produce el tratamiento con isoniacida a los chilenos sería de gran utilidad, además, poder evaluar el aumento de GPT con los niveles basales de cada paciente, para poder compararlo con la hepatotoxicidad y el uso de isoniacida. Además, esta información permitiría preparar al equipo médico para evaluar el mejor tratamiento para el paciente,

otorgarle una dosis adecuada para su tipo de metabolismo y evitar así complicaciones más graves.

Es por lo anterior dicho que se propone la siguiente hipótesis:

1.6. HIPOTESIS

La presencia de los polimorfismos C282T (Rs10411983) y G590A (Rs1799930) del gen codificante para la enzima NAT2 se relaciona(n) de manera directa con la aparición de reacciones adversas de tipo hepáticas, por el uso de isoniacida incluida en el tratamiento de pacientes con tuberculosis activa o latente, en Chile

Para demostrar dicha hipótesis se plantean el siguiente objetivo general:

1.7. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la asociación entre la presencia de los polimorfismos C282T (Rs10411983) y G590A (Rs1799930) en el gen *NAT2* y el desarrollo de hepatotoxicidad como reacción adversa a isoniacida en pacientes con tuberculosis activa o latente que llevan a cabo su tratamiento en la región Metropolitana de Chile.

1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la magnitud de la hepatotoxicidad como reacción adversa a medicamentos en pacientes con tratamiento con isoniacida para tuberculosis activa o latente.
2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos C282T y G590A en el gen *NAT2* en el grupo de pacientes estudiados.
3. Estudiar la asociación entre los distintos polimorfismos de la enzima *NAT2* (C282T y G590A) y la hepatotoxicidad (RAM de tipo hepática) por el uso de isoniacida en pacientes con tratamiento antituberculoso.

2. Metodología

Para responder a los objetivos planteados, se realizó un estudio epidemiológico, observacional, tipo caso: control, retrospectivo y prospectivo, que incluye pacientes en tratamiento anti-TB de primera línea o profiláctico con isoniacida. Se analizó la presencia y magnitud del daño hepático, además de los polimorfismos genéticos de la enzima N-acetiltransferasa 2 (NAT2) en ambos grupos para su comparación y análisis.

2.1.Pacientes

Los casos fueron obtenidos de la cohorte de pacientes controlados que han sido incluidos en tratamiento antituberculoso de primera línea o profiláctico con isoniacida, en el Hospital San Borja Arriarán y los Centros de Salud Familiar (CESFAM) asociados a este, que estén en fase de continuación de tratamiento y que presentaron hepatotoxicidad inducida por fármaco. Los controles fueron obtenidos de la cohorte de pacientes controlados que han sido incluidos en tratamiento antituberculoso de primera línea o profiláctico con isoniacida, en el Hospital San Borja Arriarán y los CESFAM y que estén en fase de continuación de tratamiento y que no presentaron la hepatotoxicidad inducida por fármaco. Este estudio consideró la evaluación retrospectiva de un grupo de pacientes que ya fueron expuestos al fármaco isoniacida como parte de un tratamiento, con el fin de determinar la presencia y magnitud del daño hepático documentada; y otro grupo de pacientes, prospectivo, en el cual, dentro de su control clínico, no se diagnosticó toxicidad hepática por isoniacida o bien presenten la toxicidad durante su tratamiento.

Para determinar a aquellos pacientes que presentaron daño hepático inducido por isoniacida, se evaluaron sus pruebas hepáticas en fase de tratamiento trisemanal (fase de continuación) para aquellos que estaban con tuberculosis activa, esto con el fin de limitar y controlar el posible efecto hepatotóxico del fármaco pirazinamida que es administrado durante la fase diaria, previa a la fase de continuación. Para los pacientes con tuberculosis latente, esto no se realiza, debido a que su tratamiento farmacológico solo incorpora isoniacida.

Adicionalmente, se realizaron análisis sobre el aumento basal de GPT de cada paciente, evaluando el valor de GPT más elevado y comparándolo con el valor de su prueba hepática

basal, tomada antes de iniciado el tratamiento, en base a esto se tomó como corte a aquellos que tuviesen un aumento de GPT basal sobre 2 veces en la fase de continuación, incluso si los valores se mantenían dentro del LSN(4-50 UI para hombres y 4-35 UI para mujeres).

Además, se obtuvieron los datos clínicos del paciente, como su edad, peso, género, pertenencia a etnia y los resultados de sus exámenes de niveles de transaminasas y bilirrubina, tanto al inicio del tratamiento como los solicitados en sus controles mensuales.

2.1.1. Selección de voluntarios

Subgrupo 1A: Casos de TB activa o latente: Se seleccionaron los pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar o extrapulmonar activa en tratamiento con fármacos de la primera línea incluida isoniacida, o tratamiento profiláctico por tuberculosis latente o que sean contacto de un paciente con tuberculosis activa con isoniacida, que presentaron grado de hepatotoxicidad superior o igual a grado 1 respecto a la tabla presentada por LiverTox, utilizando los valores de GPT de cada paciente, y sean aptos para comprender su participación en el estudio.

Subgrupo 1B: Segundo grupo de casos de TB activa o latente: Es similar a lo descrito para el Subgrupo 1A, pero, en este grupo, están aquellos pacientes que presentaron un aumento de sus niveles de GPT superior a dos veces su propio valor de GPT al iniciar el tratamiento, o sea, se evaluaron sus propios valores de GPT y cuantas veces aumentaron con respecto a su primer examen, independientemente de si este supera o no el LSN.

Subgrupo 2A: Controles de TB activa o latente o contactos de pacientes con TB activa: Se seleccionaron los pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar o extrapulmonar activa, en tratamiento con fármacos de la primera línea incluida isoniacida, en fase de continuación, y pacientes con tuberculosis latente o que fueron contacto de un paciente con tuberculosis activa, en tratamiento profiláctico con isoniacida, que no presentaron eventos de hepatotoxicidad de acuerdo con el criterio señalado de la tabla LiverTox, durante la administración del tratamiento completo, que asistan regularmente a la toma de los fármacos y aptos para comprender su participación en el estudio.

Subgrupo 2B: Controles TB activa o latente: Es similar al subgrupo 2B, pero aquí los pacientes controles son aquellos que no presentaron un aumento del doble o más de sus niveles de GPT al inicio de su tratamiento.

2.1.2. Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión

- Paciente con tuberculosis pulmonar o extrapulmonar activa en tratamiento con fármacos de la primera línea, fase de continuación incluida isoniacida y pacientes con tuberculosis latente o que sean contacto de un paciente con tuberculosis activa, en tratamiento profiláctico con isoniacida, y que presenten nivel de daño hepático 1 o superior ya descritos (casos), o que no manifiesten eventos de hepatotoxicidad (controles).

Criterios de exclusión

- Paciente no apto para comprender el consentimiento informado (Anexo N°1).
- Paciente no apto para extracción sanguínea mediante venopunción en antebrazo.
- Pacientes embarazadas.
- Pacientes menores de 18 años.
- Paciente con pruebas hepáticas alteradas al inicio del tratamiento.
- Paciente con cepa resistente a isoniacida al estudio de susceptibilidad inicial.

2.1.3. Reclutamiento

Subgrupo 1 A y B: Mediante invitación durante el control de tratamiento de tuberculosis activa, para la entrega de la información del estudio. Si el paciente muestra interés en ser reclutado, se realizará el proceso de consentimiento informado.

Subgrupo 2 A y B: Mediante invitación durante el control de tratamiento de tuberculosis latente o de contacto (control de pruebas hepáticas). Si el paciente muestra interés en ser enrolado, se realizará el proceso de consentimiento informado y la toma de muestra en el Hospital o CESFAM correspondiente.

2.2.Población general chilena

Para evaluar la frecuencia de los polimorfismos a estudiar, primero se seleccionaron muestras de población general chilena, y se seleccionó un grupo de muestras del total (500 aproximadamente) que se encuentran en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética. Estas muestras comprenden voluntarios chilenos (nacidos en Chile) y mayores de 18 años. Para los análisis de la presencia de los polimorfismos C282T (Rs10411983) y G590A (Rs1799930) en el gen *NAT2*, se utilizaron sondas *TaqMan*® descritas en la Tabla N°5. Primero, se re-cuantificaron las concentraciones de DNA de aproximadamente 250 muestras, seleccionando razones de absorbancias 260/280nm y 260/230nm iguales o superiores a 1,8, trabajando con un total de 103 para los análisis. Además de esto, se evaluó la mezcla aborígen caucásica mediante el sistema ABO según el método de Bernstein (Matson *et al*, 1966; Acuña *et al*, 2000), utilizando para el alelo O la frecuencia 0,6465 para españoles y 1,0000 para los aborígenes chilenos.

2.3.Obtención del ADN genómico (gDNA)

Se obtuvieron 5mL de sangre total venosa periférica con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, hasta 24h posterior a su obtención, el *buffy coat* obtenido fue traspasado a un tubo Eppendorf y congelado a -80 °C hasta su uso. El DNA genómico (gDNA) de los participantes del estudio, fue extraído desde los *buffy coat*, utilizando el kit de purificación E.Z.N.A. Blood DNA Mini Kit, OMEGA®, siguiendo las indicaciones del proveedor. La pureza y concentración de gDNA se determinó espectrofotométricamente utilizando el equipo Denovix®, modelo:DS-11, FX Serie *Spectrophotometer*, USA. Se consideró como muestra apta para ser sometida a análisis,

aquellas con razones de absorbancias 260/280 nm y 260/230 nm iguales o superiores a 1,8. Las muestras de gDNA fueron conservadas a -20°C hasta su análisis.

2.4. Análisis genotípico

La determinación de los genotipos se realizó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). La identificación de las variantes alélicas se llevó a cabo mediante sondas *TaqMan*® para ensayos de genotipificación (Thermo Fischer Scientific Inc.®, Número de catálogo: 4362691) capaces de discriminar los SNPs de interés. La identificación de las sondas se indica en la Tabla N°5. El protocolo estándar consideró como mezcla de reacción 30ng de gDNA, 5µl de 2X *Genotyping Master Mix* (N° de catálogo 4371355), 0,5 µl de 20X *TaqMan*® SNP *Genotyping Assay* (contiene las sondas y partidores correspondientes) de Thermo Fishier Scientific Inc.®, y agua grado biología molecular, libre de nucleasas (HyPure™ de HyClone laboratorios) en cantidad suficiente para 10 µl de volumen final de reacción.

Para la amplificación se utilizó el equipo Stratagene® Mx3000P (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), el programa considera un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 10 min, y 50 ciclos constituidos por 15s de denaturación a 92°C, 90s de alineamiento a 60°C y 60s de elongación a 72°C.

Tabla N°5: Datos de los SNPs a estudiar, la secuencia contexto y el número del catálogo de la sonda *TaqMan*®.

Gen (SNP)	Secuencia contexto*	N° de catálogo
NAT2 (rs1041983)	CCACAATGTTAGGAGGGTATTTTAA[C/T]ATCCCTCCAGTTAACAAATACAGCA	C___8684085_20
NAT2 (rs1799930)	ATATACTTATTACGCTTGAACCTC[A/G]AACAAATTGAAGATTTGAGTCTATG	C___1204091_10

*La región entre corchetes indica el cambio nucleotídico.

2.5. Análisis estadístico

Para los factores de riesgo de hepatotoxicidad se calcularon Odds ratios (OR) con intervalos de confianza del 85% con modelos de regresión logística univariado. Los factores de riesgo que resulten con $P < 0,2$ en el modelo de regresión logístico univariado, se ingresaron en el modelo de regresión logístico multivariado. Las variantes genéticas fueron analizadas como modelo de herencia codominante, dominante y recesivo. Las variables cuantitativas se trataron como tal, o bien como variable dicotómica, categorizada en dos respecto a: edad siendo mayor a 60 años o mayor a 45 años (media), lo mismo ocurre con el IMC (Índice de masa corporal), el cual fue evaluado con respecto a la media (24,22(kg/m²)).

El subgrupo 1A y 2A se compararon para unos análisis, mientras que el subgrupo 1B y 2B para otro análisis.

Los análisis estadísticos se realizaron con una significancia de 0,05 y se utilizó el programa estadístico STATA versión 11.1.

2.6. Aspectos éticos

Para su realización, el proyecto fue aprobado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central (SSMC, Ministerio de salud) (Anexo N°2).

3. Resultados

3.1. Frecuencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en población general chilena

Dado que no hay estudios preliminares de los polimorfismos C282T y G590A del gen NAT2 en la población chilena, se procedió a determinar los genotipos presentados en un grupo general.

Del total de muestras analizadas de población general chilena, se seleccionaron un total de 103 para analizar las variantes genéticas, que luego quedaron como un n de 97 para la variante rs1041983 y de 100 para rs1799930. Para la primera variante genética (rs1041983), 50 individuos presentaron genotipo CC (51,55%), 39 genotipo CT (40,21%) y 8 el genotipo TT (8,25%), para el alelo T, la frecuencia alélica obtenida fue de 28%. Por su parte, para la variante genética rs1799930, se observaron 69 individuos con genotipo GG (69%), 31 con genotipo GA (31%) y ninguno presentó el genotipo AA, para el alelo A, la frecuencia alélica obtenida fue de 16%. Los resultados tanto de las frecuencias genotípicas como alélicas es posible observarlos en la tabla N°6.

Tabla N°6: Tamaño muestral y las frecuencias genotípicas y alélicas para los SNP en estudio en una población general chilena.

Gen	SNP	rs	N	Genotipo y frecuencia genotípica			Frecuencia alélica
				CC	CT	TT	T
<i>NAT2</i>	282C>T	rs1401983	97	50 (51,55%)	39 (40,21%)	8 (8,25%)	0,28
				GG	GA	AA	A
<i>NAT2</i>	590G>A	rs1799930	100	69 (69%)	31(31%)	0 (0%)	0,16

Se determinó si la población estudiada se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg, esto se realizó a través de la prueba de chi cuadrado con un grado de libertad y Alpha=0,05; este cálculo entregó como información que para ambas variantes genéticas nuestra población en estudio se encuentra en equilibrio (Robin, 2015).

Para esta muestra, además se evaluó la mezcla aborígen caucásica utilizando el grupo ABO, de las 100 muestras, solo 62 contaban con datos de sus grupos sanguíneos, lo que entregó un porcentaje de mezcla aborígen de 41,5%.

3.2. Características generales de los pacientes reclutados

Para la realización de este trabajo, fueron reclutados pacientes diagnosticados con tuberculosis activa o latente en todos los centros de salud asociados al Servicio de Salud Metropolitano Central (SSMC), que consisten en los 20 CESFAM que incorporan a las comunas de Santiago, Estación Central, Maipú, Cerrillos y parte de Pedro Aguirre Cerda, además del Hospital Clínico San Borja Arriarán, que es el centro donde converge el equipo de tuberculosis para tener un seguimiento de los pacientes incluidos en el programa.

Hasta la fecha de entrega de esta tesis, se recolectaron 41 muestras del total de pacientes que se atienden en el SSMC en el año 2019, que fueron un total de 297. Para determinar la aparición de RAM, o daño hepático en cada paciente, se accedió a los datos de cada ficha clínica y de sus pruebas hepáticas.

Del total de 41 pacientes, luego de evaluar los criterios de exclusión, inclusión y revisión de fichas clínicas, sólo 37 fueron parte de los análisis realizados en esta tesis, debido a pacientes que abandonaron tratamiento (2), presentaron exámenes alterados al inicio de este (1), o se encontraban con tratamiento MDR sin isoniacida (1).

De acuerdo con los datos obtenidos de las fichas clínicas, se reclutaron 15 pacientes de sexo femenino (40,54%) y 22 de sexo masculino (59,46%), con una edad promedio de 45 años (D.E.: $\pm 19,29$), un IMC promedio de 24,24 kg/m². Del total de pacientes reclutados, 21 son chilenos (56,76%) y 16 extranjeros (43,24%). Aquellos que presentaron TB en su forma activa fueron 34 (91,89%) y 3 en su forma latente (8,11%). Es posible observar lo ya mencionado de forma clara en la tabla N°7, además de otros datos adicionales de posible interés, como lo es el consumo de alcohol, que, para este caso, 9 pacientes (24,32%) mencionaron que lo consumían. Para el consumo de tabaco, 11 individuos mencionaron que fuman o fumaban (29,73%). Por último, para el consumo de fármacos, se consideró cualquier fármaco que el paciente se encontrara consumiendo de manera crónica o durante el tratamiento con isoniacida, del total, 14 pacientes registraron consumos de otros fármacos (37,83%).

Tabla N°7: Caracterización de los pacientes reclutados para este estudio

Características		n	%
Total de pacientes		37	100
Sexo	Femenino	15	40,54
	Masculino	22	59,46
Edad (años)			
Media 45 ± 19,88 (D.E)			
	18-45	21	56,76
	46-94	16	43,24
IMC promedio (kg/m ²)	24,24	--	--
Nacionalidad	Chilena	21	56,76
	Boliviana	1	2,70
	Colombiana	4	10,81
	Ecuatoriana	1	2,70
	Haitiana	3	8,11
	Peruana	5	13,51
	Venezolana	2	5,41
Tuberculosis	Activa	34	91,89
	Latente	3	8,11
Consumo de otros fármacos (anexos al tto. De TBC)		14	37,83
Consumo de tabaco		11	29,73
Consumo de alcohol		9	24,32

3.3.Evaluación de daño hepático y cambios en niveles de GPT en pacientes reclutados

Para determinar el grado de severidad de cada paciente, se utilizaron los parámetros de alteración en los niveles de GPT con respecto al LSN (Límite Superior Normal) que se presentaron en la tabla N°2, los que se pueden observar de manera simplificada en la siguiente tabla resumen N°8:

Tabla N°8: Parámetros de alteración de los niveles de GPT y grado de severidad del daño hepático basado en graduación LiverTox.

Veces de aumento con respecto al LSN	Grado de severidad
<1,25	0
1,25-2,25	1
>2,5-5,0	2
>5,0-10	3
>10	4

Tabla modificada de: LiverTox, NIH (<http://livertox.nlm.nih.gov/Severity.html>).

De acuerdo con lo mencionado en la metodología para determinar el nivel de daño hepático, del total de pacientes (37), 12 de ellos presentaron alteraciones en sus niveles de GPT relacionada a grado de severidad de daño hepático (≥ 1 , ver Tabla N°8), lo que equivale a un 32,43% del total de pacientes analizados. De los pacientes que presentaron hepatotoxicidad, 9 de ellos presentaron grado 1 (24,32%), 2 pacientes presentaron grado 3 (5,41%) y 1 presentó el grado 4 (2,70%). Ninguno de los pacientes estudiados presentó el grado 2. Figura N°5.

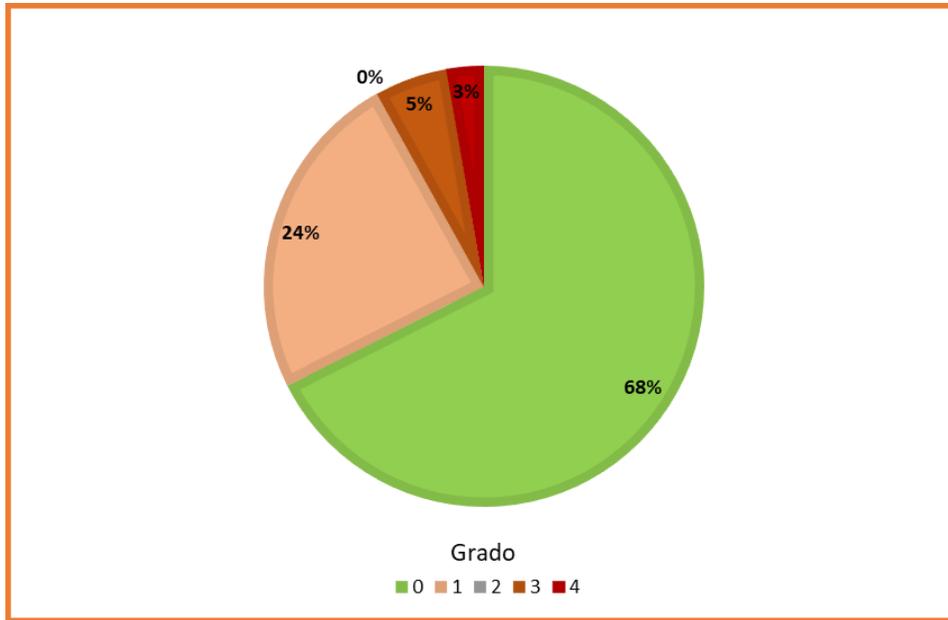


Figura N°5: Distribución de pacientes y niveles de hepatotoxicidad de grado 0 a 4 de acuerdo con la tabla LiverTox

Por otra parte, en esta tesis se evaluó cuantos pacientes de los analizados presentaban alteraciones de sus niveles de GPT de dos veces o más respecto a su primer examen de diagnóstico, o, dicho de manera más general, su valor basal, independiente de si este aumento superaba o no el valor del LSN. De estos datos, 12 pacientes presentaron un aumento de GPT de 2 veces o más respecto a su nivel basal (32,43%). Lo anteriormente mencionado es posible de observar claramente en el siguiente gráfico (Figura N°6).

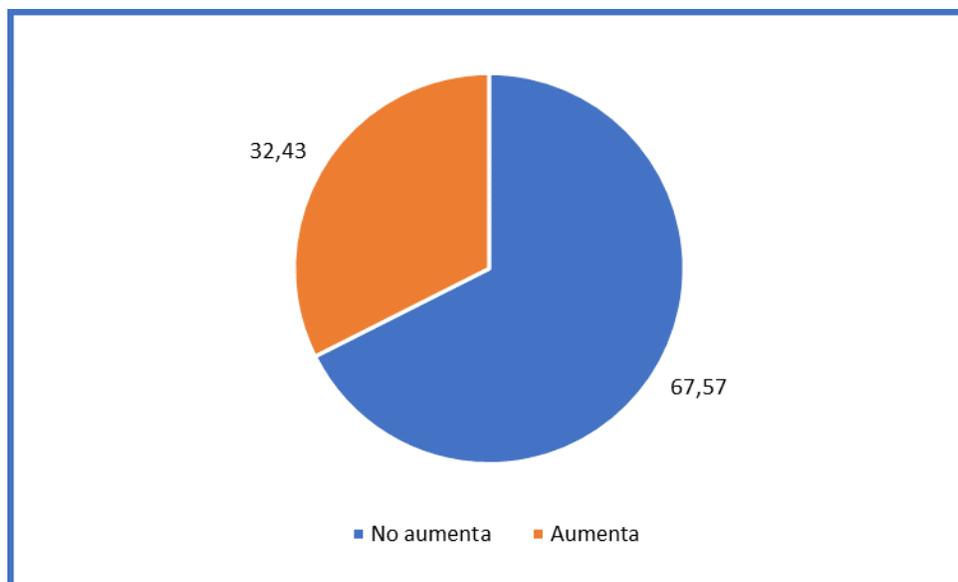


Figura N°6: Porcentaje de pacientes que presentaron un aumento de dos veces o más de GPT con respecto a su valor vs aquellos que no presentaron aumento.

Del total de 37 pacientes, como se describió anteriormente, 21 de ellos son de nacionalidad chilena, y de acuerdo con los análisis de sus fichas clínicas, del total de 21, 7 de ellos presentaron un nivel de hepatotoxicidad mayor o igual a grado 1, lo que corresponde a un 33,3% del total de pacientes chilenos, y a un 18,9% del total de pacientes. El mismo porcentaje fue encontrado para aquellos pacientes chilenos que presentaron un aumento de sus niveles de GPT de dos veces o más con respecto a su valor basal.

3.4.Determinación de polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en el gen NAT2 en pacientes reclutados

La determinación de la presencia de los polimorfismos genéticos, para la población en estudio, se realizó mediante discriminación alélica utilizando sondas *TaqMan*® mediante PCR en tiempo real. Primero se evaluaron las frecuencias para el tamaño muestral total (37), para la variante genética rs1041983, se observó que 17 pacientes presentaban el genotipo CC (45,95%), 15 el genotipo CT (40,54%) y 5 el genotipo TT (13,51%). Para el caso de la variante rs17599930, 29 pacientes presentaron el genotipo GG (78,38%) y 8 el genotipo GA

(21,62%), no se encontró la presencia del genotipo AA en ningún paciente. Los resultados obtenidos para la población en estudio con un n=37 se observan en la tabla N°9.

Tabla N°9: Frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para los polimorfismos rs1041983 y rs1799930 del gen NAT2, para la población total de pacientes analizados, N=37.

Gen	SNP	rs	n	Genotipo y frecuencia genotípica			Frecuencia alélica
				CC	CT	TT	T
<i>NAT2</i>	C282T	1041983	37	17(45,95%)	15(40,54%)	5(13,51%)	0,34
				GG	GA	AA	A
<i>NAT2</i>	G590A	1799930	37	29(78,38%)	8(21,62%)	0(0%)	0,11

Además, se evaluaron las mismas frecuencias genotípicas y alélicas, pero sólo en los pacientes de nacionalidad chilena, con un n total de 21. Para la variante rs1041983, se encontró el genotipo CC en 10 pacientes (47,62%), el genotipo CT en 8 pacientes (38,10%) y el genotipo TT en 3 pacientes (14,29%). Con respecto a la variante rs1799930, 14 pacientes presentaron el genotipo GG (66,67%), 7 el genotipo GA (33,33%) y ninguno presentó el genotipo AA. Esta evaluación puede observarse a detalle en la tabla N°10:

Tabla N°10: Frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para los polimorfismos rs1041983 y rs1799930 del gen NAT2, solo para aquellos pacientes de nacionalidad chilena, N=21.

Gen	SNP	rs	n	Genotipo y frecuencia genotípica			Frecuencia alélica
				CC	CT	TT	T
<i>NAT2</i>	C282T	1041983	21	10(47,62%)	8(38,10%)	3(14,29%)	0,33
				GG	GA	AA	A
<i>NAT2</i>	G590A	1799930	21	14(66,67%)	7(33,33%)	0(0%)	0,17

Con respecto a este objetivo, se evaluaron primero que todo, ambas variantes genéticas, para observar si ambas se encontraban o no en equilibrio de *Hardy-Weinberg*; para este caso,

utilizamos Test exacto de Fisher, ya que permite evaluar el equilibrio en poblaciones pequeñas y que presenten genotipos en bajo número (Robin, 2015).

De acuerdo con lo evaluado, para ambas variantes genéticas se presenta el equilibrio, por lo que, al igual que para los resultados preliminares, podemos decir que lo que observamos se espera que siga ocurriendo de generación en generación, de manera estable (Robin, 2015).

3.5.Relación entre la presencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) del gen NAT2 y la aparición de hepatotoxicidad

3.5.1. Grado de hepatotoxicidad 1 o superior

Como primer paso, se decidió evaluar la relación entre factores no genéticos y la aparición de hepatotoxicidad inducida por isoniacida llevando a cabo regresiones logísticas univariadas de la aparición de daño hepático con grado de severidad ≥ 1 y la presencia de estos factores. Los factores no genéticos evaluados fueron: el IMC, IMC respecto a la media ($\geq 24,24$ (kg/m²)); edad de riesgo (≥ 60 años); edad con respecto a la media (≥ 45 años); sexo; y consumo de alcohol. Estos factores también fueron evaluados como modelos de regresión logística multivariada junto a los factores genéticos. Para esto se utilizó el programa estadístico STATA versión 11.1

En orden, se puede observar en la siguiente tabla, la relación que existe entre los factores de riesgo: sexo, edad, consumo de alcohol e IMC, y la aparición del grado de hepatotoxicidad mayor o igual a grado 1, mediante las regresiones logísticas univariadas respectivas (Tabla N°11). Como dato de relevancia, aquellos análisis que consideran la variable del IMC presentan un n de 36 en vez del n total de 37 pacientes, debido a que no se logró conseguir el IMC de uno de los pacientes en el estudio. Dentro de nuestros resultados, podemos destacar el IMC estudiado con variante cuantitativa, con un OR de 1,23 y un *p value* de 0,025, alcanzando la significancia estadística. Además, el IMC con respecto a la media, entregó un OR de 4,50, y, si bien no llega a la significancia estadística, está muy cerca de conseguirla (*p value* = 0,05). Para los demás factores, no se encontró significancia estadística. Esto quiere

decir que estos factores no genéticos no se relacionan con la aparición del evento de hepatotoxicidad, como si ocurre con el IMC.

Tabla N°11: Análisis regresión logística univariado, de cada factor no genético con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida.

Variable (n)	OR	95% IC	p value
Sexo (37)			
Hombre	1,00		Ref.
Mujer	1,07	0,26-4,34	0,923
Edad de riesgo (37)			
<60 años	1,00		Ref.
≥ 60 años	1,28	0,29-5,67	0,740
Edad respecto a la media (37)			
<45 años	1,00		Ref.
≥ 45 años	2,48	0,60-10,17	0,205
Consumo de alcohol (37)			
No	1,00		Ref.
Si	2,00	0,42-9,41	0,381
IMC (36)			
	1,23	1,02-1,47	0,025
IMC respecto a la media (36)			
<24,24 kg/m ²	1,00		Ref.
$\geq 24,24$ kg/m ²	4,50	0,99-20,31	0,050

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Para entender la relación entre las variantes rs1041983 y rs1799930 con la aparición de daño hepático con grado de severidad ≥ 1 se realizaron regresiones logísticas univariadas y multivariadas. Esto se realizó de manera homocigota u heterocigota y se analizaron los diferentes modelos de herencia (codominante, dominante y recesivo).

Primero, se realizó el análisis univariado para determinar la relación entre la aparición hepatotoxicidad y la presencia de la variante genética rs1041983, en modelo de herencia codominante, recesivo y dominante. Para el caso del modelo de herencia dominante, se obtuvo un OR de 6,56 para el genotipo CT y un OR de 11,25 para el genotipo TT, ambos presentaron significancia estadística (p value de 0,039 y 0,041 respectivamente). El modelo de herencia recesivo no arrojó resultados significativos. Por último, el modelo de herencia

dominante entregó un OR de 7,50 y un *p value* de 0,021, además de presentar un intervalo de confianza menor que para el modelo codominante, lo que significa que el valor de OR entregado es más preciso (1,34-41,72). Lo ya mencionado se puede observar en la tabla N°12.

Tabla N°12: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1041983, utilizando diferentes modelos de herencia, con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida.

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	<i>P value</i>
Codominante (37)			
C/C	1,00		Ref.
C/T	6,56	1,09-39,32	0,039
T/T	11,25	1,10-114,36	0,041
Recesivo (37)			
C/C + C/T	1,00		Ref.
T/T	3,83	0,54-26,89	0,176
Dominante (37)			
C/C	1,00		Ref.
C/T + T/T	7,50	1,34-41,72	0,021

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

En la tabla N°13, se observa el análisis de regresión logística univariado de la presencia de la variante rs 1799930 en el modelo de herencia codominante y su relación con la aparición del daño hepático con grado de severidad 1 o superior. Es importante destacar que el modelo de herencia recesivo no entregó resultados, debido a que ningún paciente presentó el genotipo AA, y el modelo de herencia dominante entregó los mismos resultados que se observaron en el modelo codominante. Para este caso, no encontramos significancia estadística para esta variante y la presencia de daño hepático, con un *p value* de 0,173 y un OR de 2,85 para el genotipo GA.

Tabla N°13: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida.

NAT2 rs1799930	OR	95% IC	<i>p-value</i>
(n)			
Codominante (37)			
G/G	1,00		Ref.
G/A	2,85	0,63-12,92	0,173
A/A	--	--	--

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Luego, se evaluaron modelos de regresión logística multivariado para determinar la contribución de cada factor con la aparición de hepatotoxicidad. Primero, se evaluaron ambos polimorfismos analizados, con cada modelo de herencia para la variante rs1041983 y el modelo codominante para la variante rs1799930. Como se puede observar en las tablas N°14 y 15, no se encontró significancia estadística para los modelos multivariados utilizando los modelos de herencia recesivo y codominante, ni para ambas variables por separado. Se destaca que para el modelo que consideraba la variante rs1041983 en modelo dominante y la variante rs1799930 en modelo codominante, entregaron un *p value* significativo para el modelo, de 0,03 y con un pseudo R^2 de 0,14, lo que significa que estas variables explican en un 14% el modelo. Si se debe notar que, para este modelo, la variante genética rs1799930 no presenta significancia ni presenta varianza en su OR. Esto es posible observarlo en la tabla N°16.

Tabla N°14: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia codominante) y variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante) con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value	p value=0,07
Codominante (37)				Pseudo R²=0,14
C/C	1,00		Ref.	
C/T	6,73	0,93-48,40	0,058	
T/T	11,62	0,90-149,59	0,060	
NAT2 rs1799930 (n)				
Codominante (37)				
G/G	1,00		Ref.	
G/A	0,94	0,16-5,59	0,952	
A/A	--	--	--	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Tabla N°15: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia recesivo), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante) con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value	p value=0,23
Recesivo (37)				Pseudo R²=0,06
C/C + C/T	1,00		Ref.	
T/T	2,89	0,37-22,30	0,307	
NAT2 rs1799930 (n)				
Codominante (37)				
G/G	1,00		Ref.	
G/A	2,30	0,47-11,23	0,303	
A/A	--	--	--	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Tabla N°16: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs 1041983 (modelo de herencia dominante), variante genética rs 1799930 (modelo de herencia codominante) con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value	p value=0,03
Dominante (37)				Pseudo R²=0,14
C/C	1,00		Ref.	
C/T + T/T	7,50	1,09-51,51	0,040	
NAT2 rs1799930 (n)				
Codominante (37)				
G/G	1,00		Ref.	
G/A	1,00	0,17-5,77	1,00	
A/A	--	--	--	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Además, para los análisis multivariados de 2, y 3 variables, se evaluaron tanto los factores no genéticos como los genéticos que presentaron *p value* menor a 0,2, de esta manera, para los modelos se evaluaron el IMC, IMC con respecto a la media, edad con respecto a la media (esta se agregó por estar cerca del límite, *p value* = 0,205), la variante genética rs1041983 en modelo de herencia dominante (por sus valores estadísticos entregados) y la variante genética rs1799930 en modelo de herencia codominante. Esto con el fin de poder observar una posible relación entre ellos y así ver si se obtiene un modelo de interés para el evento de hepatotoxicidad.

Primero se evaluó el modelo con la variante genética rs1041983 modelo de herencia dominante y el IMC con respecto a la media, para este modelo se obtuvieron OR de 10,99 para la variante y un OR de 7,67 para el factor no genético. El modelo multivariado obtuvo un *p value* de 0,003 y un pseudo R² de 0,25, lo que significa que ambas variables explican en un 25% el modelo. Además, cada variable entregó *p values* significativos por separado en el modelo, es posible observar lo mencionado en la tabla N°17.

Tabla N°17: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs 1041983 (modelo de herencia dominante) y el IMC con respecto a la media (24,22 (kg/m²)), con el grado de severidad de daño hepático ≥1, en pacientes a los que se les administró isoniacida.

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value	p value=0,003
Dominante (36)				Pseudo R²=0,25
C/C	1,00		Ref.	
C/T + T/T	10,99	1,45-82,92	0,020	
IMC con respecto a la media (36)				
<24,24 kg/m ²	1,00		Ref.	
≥24,24 kg/m ²	7,67	1,20-49,03	0,031	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Para el modelo de regresión logística multivariado que considera la variante genética rs1041983 y los factores no genéticos IMC respecto a la media y edad respecto a la media, observamos que se obtuvieron OR de riesgo de 11,83 para la variante genética, 9,44 para el IMC y 3,42 para la edad, tanto la variante genética como el IMC por su parte presentaron significancia estadística (*p value* de 0,020 y 0,025 respectivamente). Además, el modelo entregó significancia con un *p value* de 0,004 y un pseudo R² de 0,29, lo que significa que estas variables explican en un 29% el modelo. En la tabla N°18 se observa lo mencionado.

Tabla N°18: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs 1041983 (modelo de herencia dominante), el IMC con respecto a la media (24,24 (kg/m²)) y la edad con respecto a la media (45 años), con el grado de severidad de daño hepático ≥ 1 , en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(36)	OR	95% IC	P value	<i>p value=0,004</i> Pseudo R²=0,29
Dominante				
C/C	1,00		Ref.	
C/T + T/T	11,83	1,48-94,27	0,020	
IMC con respecto a la media (36)				
<24,24 kg/m ²	1,00		Ref.	
$\geq 24,24$ kg/m ²	9,44	1,31-67,61	0,025	
Edad con respecto a la media (36)				
<45 años	1,00		Ref.	
≥ 45 años	3,42	0,55-21,19	0,186	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Los modelos que incluyen la variante genética rs1799930 y el factor IMC no se encuentran debido a que ninguno entregó resultados significativamente estadísticos (datos no mostrados).

3.5.2. Aumento de los niveles de GPT basales al doble

Al igual que con el evento de hepatotoxicidad, también para estos casos se evaluó primero los factores no genéticos como lo son el sexo, edad de riesgo, edad con respecto a la media, IMC, IMC respecto a la media y consumo de alcohol. Para este evento, ninguna de las variables entregó resultados estadísticamente significativos, sólo la variable edad con respecto a la media tiene un OR de 4,25 con un *p value* con tendencia a la significancia (0,053). Lo mencionado puede observarse en la tabla N°19.

Tabla N°19: Análisis regresión logística univariado, de cada factor no genético con el aumento de GPT al doble del basal, en pacientes a los que se les administró isoniacida.

Variable (n)	OR	95% IC	p value
Sexo (37)			
Hombre	1,00		Ref.
Mujer	0,36	0,15-2,67	0,538
Edad de riesgo (37)			
<60 años	1,00		Ref.
≥60 años	2,26	0,52-9,83	0,276
Edad respecto a la media (37)			
<45 años	1,00		Ref.
≥45 años	4,25	0,98-18,39	0,053
Consumo de alcohol (37)			
No	1,00		Ref.
Si	2,00	0,42-9,41	0,381
IMC (36)			
	1,11	0,95-1,29	0,158
IMC respecto a la media (36)			
<24,24 kg/m ²	1,00		Ref.
≥24,24 kg/m ²	2,55	0,59-10,91	0,207

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Para conocer el efecto que las variantes genéticas estudiadas tienen sobre el evento del aumento de los valores de GPT basal al doble, al igual que se realizó anteriormente, se analizaron los polimorfismos en estudio, en los modelos de herencia codominante, recesivo y dominante. Cabe destacar que para la variante genética rs1799930, sólo se realizó el análisis para modelo de herencia codominante, ya que al no haber ningún sujeto que presentara el genotipo homocigoto A/A, no fue posible realizar los análisis para los otros modelos. Ninguna de las variantes entregó datos estadísticamente significativos, aunque la variante rs1041983 en modelo de herencia dominante entregó OR de 3,81 con un *p value* de 0,085. Es posible observar los resultados en las tablas N°20 y N°21 que se encuentran a continuación.

Tabla N°20: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1041983 utilizando diferentes modelos de herencia, con el aumento de GPT al doble del basal, en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value
Codominante (37)			
C/C	1,00		Ref.
C/T	3,11	0,61-15,70	0,170
T/T	7,00	0,79-61,97	0,080
Recesivo (37)			
C/C + C/T	1,00		Ref.
T/T	3,83	0,54-26,89	0,176
Dominante (37)			
C/C	1,00		Ref.
C/T + T/T	3,81	0,82-17,57	0,085

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Tabla N°21: Análisis regresión logística univariado, variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida.

NAT2 rs1799930 (n)	OR	95% IC	p-value
Codominante (37)			
G/G	1,00		Ref.
G/A	2,85	0,63-12,92	0,173
A/A	--	--	--

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Al igual que con los análisis anteriores, se realizaron regresiones multivariadas, primero, analizando ambas variantes genéticas, en los distintos modelos de herencia, para los tres casos, ningún modelo entregó datos con significancia estadística ni tampoco entregó

significancia para cada variante por si sola dentro del modelo. Se puede evaluar lo mencionado en las tablas N°22, 23 y 24.

Tabla N°22: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia codominante), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value	p value=0,26
Codominante (37)				Pseudo R²=0,08
C/C	1,00		Ref.	
C/T	2,65	0,42-16,69	0,299	
T/T	5,73	0,50-64,89	0,159	
NAT2 rs1799930 (n)				
Codominante (37)				
G/G	1,00		Ref.	
G/A	0,94	0,16-5,59	0,952	
A/A	--	--	--	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Tabla N°23: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia recesivo), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value	p value=0,23 Pseudo R²=0,06
Recesivo (37)				
C/C + C/T	1,00		Ref.	
T/T	2,89	0,37-22,30	0,307	
NAT2 rs1799930 (n)				
Codominante (37)				
G/G	1,00		Ref.	
G/A	2,30	0,47-11,23	0,303	
A/A	--	--	--	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Tabla N°24: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia dominante), variante genética rs1799930 (modelo de herencia codominante), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(n)	OR	95% IC	P value	p value=0,17 Pseudo R²=0,07
Dominante (37)				
C/C	1,00		Ref.	
C/T + T/T	3,11	0,52-18,38	0,210	
NAT2 rs1799930 (n)				
Codominante (37)				
G/G	1,00		Ref.	
G/A	1,50	0,25-8,81	0,654	
A/A	--	--	--	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Luego, se realizaron los análisis multivariados de 2 y 3 variables, tomando en consideración todas las variables que se han mostrado con anterioridad que presentaron *p value* menores a 0,2 en los análisis univariados. Para este caso, las variables utilizadas fueron: edad respecto a la media, IMC, IMC respecto a la media, variante rs1041983 modelo de herencia dominante y rs1799930 modelo de herencia codominante.

Primero se evaluó la variante genética rs1041983 modelo de herencia dominante y la edad con respecto a la media, para este caso el modelo presenta significancia estadística con un *p value* de 0,02, además el modelo entregó un pseudo R² de 0,15, mostrando que estas variables explican en un 15% el modelo. Se debe destacar que, si bien ambas variables presentan OR de riesgo, ninguna presenta significancia, con *p value* de 0,083 para la variante genética y 0,052 para la edad (Tabla N°25).

Tabla N°25: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia dominante) y la edad con respecto a la media (45 años), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida.

NAT2 rs1041983(37)	OR	95% IC	P value	p value=0,02
Dominante				Pseudo R²=0,15
C/C	1,00		Ref.	
C/T + T/T	4,24	0,82-21,68	0,083	
Edad con respecto a la media (37)				
<45 años	1,00		Ref.	
≥45 años	4,67	0,98-22,18	0,052	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Por último, se analizó el modelo que consideraba las variables: variante genética rs1041983 modelo de herencia dominante, IMC y edad respecto a la media. Para este caso, se obtuvo un modelo con un *p value* de 0,03, alcanzando la significancia, además de un pseudo R² de 0,20. Si bien se consigue la significancia estadística para el modelo, se debe considerar que ninguna

de las variables por sí mismas consiguió la significancia. La tabla N°26 muestra estos resultados.

Tabla N°26: Análisis regresión logística multivariado, variante genética rs1041983 (modelo de herencia dominante), IMC, y la edad con respecto a la media (45 años), con el aumento de los valores de GPT basal al doble, en pacientes a los que se les administró isoniacida

NAT2 rs1041983(36)	OR	95% IC	P value	p value=0,03
Dominante				Pseudo R²=0,20
C/C	1,00		Ref.	
C/T + T/T	4,46	0,77-25,60	0,093	
IMC (36)	1,15	0,97-1,38	0,104	
Edad con respecto a la media (36)				
<45 años	1,00		Ref.	
≥45 años	4,66	0,88-24,49	0,069	

IC = Intervalo de confianza; OR = Odds Ratio; p-value < 0,05 es considerado significativo; Ref. = Referencia

Para estos análisis, no se encuentran los resultados que presenten el IMC respecto a la media y la variante rs1799930 debido a que su presencia no entregó resultados con valores significativos (datos no mostrados).

4. Discusión

La farmacogenética ha permitido entender de mejor manera como los individuos responden a los fármacos, buscando como meta principal el desarrollo de la medicina personalizada (Mini & Nobili, 2009). Esto se observa ya en la actualidad, siendo un ejemplo clave de ello la Warfarina, donde su estudio farmacogenético ha permitido determinar la dosis para cada paciente dependiendo si presenta o no ciertos polimorfismos (Ruff, 2018). Además de estos aportes, también ha permitido entender de mejor manera por que se producen las RAM en ciertos individuos, como es en el caso de fármacos antiepilépticos (Fricke-Galindo et al, 2018). Hoy en día, esta rama de la ciencia también ha ayudado a aportar conocimiento para entender mejor cómo y por qué se producen las RAM en el caso del tratamiento antituberculoso, prevenir esta situación permitiría que el paciente no presente ninguna situación de riesgo para su salud y cumpla el tratamiento en su totalidad (Yamamoto *et al*, 1986; Zabost *et al*, 2013; Huang, 2014). En la actualidad se conoce que existen variaciones genéticas relacionadas con la aparición de la hepatotoxicidad, pero no se ha llevado a cabo ningún estudio de esta índole en el país, por lo que desconocemos cómo se relacionan estos polimorfismos y la aparición de daño hepático. Es necesario entender este comportamiento en nuestra población, aunque existan estudios en otras poblaciones, debido a que la frecuencia de los distintos polimorfismos se ha visto que varían dependiendo de la población evaluada (Teixeira *et al*, 2010; Taja-Chayeb *et al*, 2012; Khan *et al*, 2013). Este estudio ha permitido un primer acercamiento tanto a las frecuencias de las variantes genéticas como a su relación con la aparición de hepatotoxicidad inducida por isoniacida.

4.1.Frecuencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en población general chilena

Las variantes rs1041983 y rs1799930 del gen *NAT2* han sido estudiadas previamente, la determinación de ambos polimorfismos mediante secuenciación se ha llevado a cabo en población americana, europea, surasiática, del Asia pacífico y africana mediante el proyecto 1000 genomas (1000 Genomes Project Consortium, 2012; Patillon *et al*, 2014). Las

frecuencias de las variantes genéticas analizadas pueden observarse en la tabla N°27, donde destacado se encuentran las frecuencias obtenidas en la población general chilena.

Como podemos observar, el polimorfismo rs 1041983 posee una frecuencia del alelo T > al 0,4 en las poblaciones surasiáticas, de Asia pacífico y africanas, mientras que la población americana y europea poseen un valor mucho más cercano a lo observado en la chilena, siendo la población americana (que corresponde a una mezcla de las poblaciones mexicana, peruana, colombiana y puerto rriqueña) la más parecida en frecuencia de este alelo. Este mismo comportamiento sucede con el polimorfismo rs1799930. Este resultado, aunque no inesperado, podría explicarse en parte por la ancestría encontrada en estos tipos de poblaciones. El efecto de una ancestría con gran parte de herencia aborigen podría ser el responsable de estas frecuencias en poblaciones americanas (incluyendo la chilena). (Acuña *et al*, 2000; Arnaiz-Villena *et al*, 2010; Gneccchi-Rusccone *et al*, 2019). Se debe mencionar que, si bien en este trabajo se encontró un porcentaje de mezcla aborigen caucásica de 41,5%, este valor solo es una aproximación, debido a que no se contaba con el grupo sanguíneo de los 100 individuos evaluados.

Tabla N°27: Frecuencias de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en diferentes poblaciones.

rs	Alelo	Población general chilena	Población Americana	Población Europea	Población Surasiática	Población Asia Pacífico	Población Africana
rs1041983	Frecuencia alelo T	0,28	0,291	0,305	0,428	0,439	0,468
rs1799930	Frecuencia alelo A	0,16	0,171	0,282	0,359	0,256	0,237

Datos pertenecientes a 1000 genomas y obtenidos mediante NCBI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1799930#frequency_tab y https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1041983#frequency_tab

Como primer paso, se destaca la importancia de conocer, de manera preliminar, las frecuencias de estos polimorfismos en nuestra población, las que son muy relevantes para determinar el peso de cada genotipo en la población chilena. Aunque las poblaciones

americanas posean una frecuencia alélica menor de los alelos T para la variante rs1041983 y A para la rs1799930 en relación con otras poblaciones mundiales, el peso de algunos de estos polimorfismos en la aparición de hepatotoxicidad por isoniacida pudo ser observado en el caso de rs 1041983, como discutiremos más adelante. De igual manera, sería interesante realizar a futuro estos mismos análisis en una población mayor, de distintos sectores de la región o incluso de distintas regiones del país, para describir la presencia de estos polimorfismos de manera más detallada, comparando el porcentaje de mezcla aborigen caucásica, debido a que de norte a sur las características genéticas de la población cambian (Rocco et al, 2002). Así como también, evaluar el resto de los polimorfismos conocidos para la enzima NAT2.

4.2. Evaluación de daño hepático y cambios en niveles de GPT en pacientes reclutados

Con respecto a la aparición de daño hepático inducido por fármaco, en literatura es posible encontrar que se menciona una aparición de hasta aproximadamente un 30% (Marra *et al*, 2007; Guaoua *et al*, 2014), lo cual es cercano a lo obtenido en esta tesis (32,43%), lo que podemos considerar como una aparición de hepatotoxicidad esperable dentro del estudio. Si bien, hay que mencionar que los demás estudios consideran poblaciones y tamaños muestrales distintos, como es el trabajo de Marra *et al*, el cual se llevó a cabo en Canadá, con un total de 1061 pacientes analizados, muy lejano a lo realizado en esta tesis.

De todas formas, una de las grandes limitaciones dentro de los estudios basados en la aparición de la hepatotoxicidad inducida por fármaco, es que hoy en día no existe un parámetro fijo o consenso para determinar el grado de este (Aguayo & Rodríguez, 2011; Kaliyaperumal *et al*, 2018). Existen diferentes parámetros que pueden entregar una noción para este evento, como podemos encontrar en LiverTox, que ofrece 4 parámetros diferentes para determinar hepatotoxicidad y su nivel de gravedad. Para esta tesis se escogió una que ya había sido utilizada con antelación en un estudio similar (Chan *et al*, 2017). La importancia de determinar cuándo un individuo está presentando o no, un grado de daño hepático y cuál

es el nivel de gravedad de este, es primordial para la correcta identificación de pacientes en cada grupo (casos o controles).

Para esta tesis, se encontraron solo 3 individuos que presentaban un grado de daño hepático de más gravedad (grado 3 y 4), lo que corresponde a un 8,1% del total. Dentro de nuestros pacientes estudiados, ninguno presentó el grado de hepatotoxicidad de nivel 2, pero sí tenemos un gran número de pacientes que presentaron grado de hepatotoxicidad de nivel 1. La elevada cantidad de pacientes que presentaron grado 1 a comparación con los demás grados, puede deberse a que en el SSMC generalmente retiran el tratamiento al paciente que presente sus valores de GPT alterados y esperan que este se estabilice para readministrar los fármacos. Puede que, en nuestro caso, sólo unos pocos individuos llegaron a gravedad mayor a 3, debido a que se trató a tiempo a estos pacientes (Aguayo & Rodríguez, 2011). Ya que la aparición de hepatotoxicidad no se estudia con asiduidad, no sabemos en realidad la frecuencia de los distintos grados de este evento en el mundo y sobre todo en el país, donde no hay estándares o información oficial de su impacto en pacientes con RAM. Además, en muchos de los 20 centros incluidos en esta tesis, no son realizados los exámenes de control a cada paciente con frecuencia mensual, esto dificultó el tratamiento de datos para establecer quiénes presentaban hepatotoxicidad y su grado de severidad.

Con respecto a los resultados obtenidos para los análisis que evalúan el aumento de GPT del doble de veces con respecto al nivel basal de cada paciente (Gráfico N°2), este es de un 32,43%. Lamentablemente no se encuentran estudios que nos ayuden a evaluar si esto es concordante con lo que ocurre con otras poblaciones. Pero si es un primer acercamiento a lo que está ocurriendo con cada paciente. La importancia de estudiar el GPT de manera individual es debido a que se ha descrito que este varía dependiendo de varios factores, como la edad, género, país o etnia (Liu *et al*, 2014). Por lo que tener estos datos en la población estudiada constituye un aporte para este tema.

Lo que se puede corroborar mediante literatura, es que un aumento de las transaminasas suele ser normal (Aguayo & Rodríguez, 2011), cuando no sobrepasa el LSN, pero si, puede que este comportamiento observado sea más normal de lo que creemos, y podría permitirnos entender cómo se observa de manera clínica este aumento y su impacto en la salud del paciente. Sería interesante realizar análisis a futuro que permitan evaluar diferentes niveles

de aumento y relacionarlos con el estado de salud del paciente, y determinar qué implica esto para su funcionamiento orgánico normal.

Una de las limitantes más grandes para este trabajo fue el bajo número de pacientes reclutados. Esto se debe a varias dificultades técnicas en el reclutamiento de pacientes en ensayos clínicos, especialmente la cantidad de centros y su distancia entre ellos imposibilitaba el tener una centralización que permitiera un fácil reclutamiento de cada paciente al ingresar al programa de TB, además de la voluntad del equipo médico; estas problemáticas no son inusuales, y ocurren en estudios clínicos de todo tipo alrededor del mundo (Institute of Medicine (US), 2012; Kadam *et al*, 2016). Todo esto sumado al estallido social de octubre de 2019 y la llegada de la pandemia de COVID-19 a Chile en marzo de 2020, produjo aún más dificultades tanto en el contacto con los servicios de salud como a la posibilidad de reclutar los pacientes y seguir sus tratamientos y controles (AFP, 2019; Ministerio de Salud, 2020).

Otra limitación que afectó directamente el número de pacientes analizados, con respecto al total de reclutados, fue el del abandono de los pacientes al tratamiento; se cree, como se mencionó en este trabajo, que incluso la hepatotoxicidad puede provocar este abandono debido a que el paciente se siente mal al ingerir su tratamiento. Si bien esto es un serio problema para el sistema de salud, esta es otra limitante que no nos permite visualizar la posible gravedad de lo que provoca la hepatotoxicidad y su relación con el abandono, por eso se propone que a futuro se logre estudiar mejor estos casos y así, de este modo determinar la relación entre ambos factores.

Sumando ambos análisis, se observan datos bastante esperables dentro de nuestra población, pese a que contamos con un tamaño muestral sumamente pequeño, esto nos quiere decir que, como primer atisbo, estamos observando comportamientos similares a los de otros estudios, y que se podría desarrollar algo más interesante con un tamaño muestral mayor.

4.3.Determinación de polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) en el gen NAT2 en pacientes reclutados

Con respecto a los datos que se obtuvieron, es interesante observar que en nuestra población estudiada (n=37), al igual que ocurre con la población general chilena, tampoco observamos la presencia del genotipo AA para la variante genética rs1799930, esto incluso considerando que esta población incluye casi en un 50% la presencia de extranjeros de diferentes países, esto podría indicar que la presencia de este genotipo es rara incluso para extranjeros del continente.

Con el propósito de observar de manera clara y hacer la comparación con las frecuencias de los alelos en otras poblaciones, se elaboró la tabla N°28, donde se encuentran, de manera compilada, los datos obtenidos en esta tesis y los datos obtenidos de frecuencias en la base de datos 1000 genomas.

Tabla N°28: Frecuencias de los alelos menores (MAF) para las variantes genéticas evaluadas en la población estudiada (n=37), solo los chilenos de esta población (n=21) y la población general chilena, además de las frecuencias observadas en diferentes poblaciones del mundo*.

rs		Este estudio (n=37)	Este estudio, Chilenos (n=21)	Población general chilena	America	Europa	Sud-asia	Asia-Pacífico	Africa
rs1041983	Frecuencia alelo T	0,34	0,33	0,28	0,291	0,305	0,428	0,439	0,468
rs1799930	Frecuencia alelo A	0,11	0,19	0,16	0,171	0,282	0,359	0,256	0,237

*Datos pertenecientes a 1000 genomas y obtenidos mediante NCBI : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1799930#frequency_tab y https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1041983#frequency_tab

A simple vista, observamos que la población en estudio (n=37) se aleja de lo observado tanto en la población americana, como a lo obtenido en la población general chilena. Esto puede deberse principalmente al hecho de que esta población es sumamente heterogénea, perteneciendo a un total de siete (7) nacionalidades del continente. Si bien uno esperaría que, pese a esto, las frecuencias debiesen ser similares a las observadas en la población americana,

desconocemos la ancestría genética de todos estos individuos. Este dato puede entregarnos una pista para entender por qué ocurre esta desviación (Mathieson & Scally, 2020).

Si sólo analizamos a los chilenos de nuestra población estudio (n=21), es posible observar que existe una semejanza mayor a lo que obtuvimos en la población general chilena y a lo observado en la población americana. Ahora bien, si evaluamos cada variante genética por separado, podemos ver que para la variante rs1041983, existe una mayor semejanza a la población europea que lo que pudimos ver para la población general chilena. Es esperable que pueda ocurrir esto, debido a que es un número muy bajo de individuos, y estos valores se pueden alejar mucho de lo que realmente ocurre con la población. Además de que no contamos con ningún dato ni análisis que dé cuenta de la ancestría de los individuos, lo que puede estar llevando a que presenten semejanza a la población europea. Para el caso de la variante rs1799930, en la población en estudio que solo considera a los chilenos, vemos una mayor semejanza a la población general chilena y a la americana, que cuando se evalúa la población en estudio completa, nuevamente, para poder realizar mejores conclusiones, es necesario evaluar la ancestría de la muestra.

Como posible proyección, sería interesante seguir evaluando las frecuencias de estos polimorfismos en nuestra población local, así como en los pacientes de TB, principalmente debido a que, con el paso de los años, el nivel de migración a nuestro país ha aumentado considerablemente, lo que ha modificado nuestra población actual, tanto cultural como genéticamente.

4.4. Relación entre la presencia de los polimorfismos C282T (rs1041983) y G590A (rs1799930) del gen NAT2 y la aparición de hepatotoxicidad

4.4.1. Grado de hepatotoxicidad 1 o superior

Como se explicó durante la introducción, los posibles factores que afectan o se relacionan con la aparición de la hepatotoxicidad son principalmente 4: Sexo, edad, IMC y consumo de alcohol (Ramappa & Aithal, 2013; Xiang *et al*, 2014). Primero, para nuestros análisis que evalúan el grado de hepatotoxicidad grado 1 o superior, podemos observar que cuando se evalúa el sexo del paciente, no se observa ninguna significancia estadística (Tabla N°10), si

bien en literatura se ha mencionado que las mujeres se encuentran en mayor riesgo de presentar el evento de hepatotoxicidad, estos estudios aún no han arrojado resultados concluyentes para este factor (Wurwitz, 1969; Gronhagen-Riska *et al*, 1978;). Otros estudios han evidenciado que el riesgo en mujeres aumenta aún más al estar embarazadas o que acaban de dar la luz, por lo que el hecho de que en nuestro estudio se excluyera a las mujeres embarazadas pudo dar como resultado esta relación (Ramappa & Aithal, 2013). Otra razón posible es que los otros factores impliquen un riesgo mayor en conjunto que el sexo por sí mismo.

Existen estudios que dan cuenta de que el riesgo se encuentra en aquellos sujetos mayores a 60 años (Schaberg *et al*, 1996; Yee *et al*, 2003)), pero en nuestro caso al evaluar a aquellos mayores a 60 años con los menores (Tabla N°11), no observamos valores estadísticos significativos. Por otra parte, al evaluar el dato de la edad con respecto a la media (45 años) (Tabla N°12), podemos observar un OR de 2,48, que aunque presenta un *p-value* de 0,208, es posible que aumentando el tamaño muestral nos acerquemos a la significancia estadística, indicándonos que aquellos individuos que sean mayores a 45 años presentan un riesgo dos veces mayor a presentar el episodio de hepatotoxicidad que aquellos menores a esta edad, lo que igualmente ha sido reportado en otros trabajos que señalan que aquellos pacientes mayores a 35 años presentaban mayor riesgo (Kopanoff *et al*, 1978; Ramappa & Aithal, 2013). Es importante destacarlo, debido a que es un posible factor para tener en cuenta al momento del ingreso del paciente al programa de TB. Si bien es una edad menor a la mencionada en varias investigaciones, como ocurre con los demás factores, el conjunto de ellos presentes sumado a la edad, puede generar efectos en la aparición de la hepatotoxicidad.

Con respecto al IMC existen diversas discusiones, se ha encontrado que el estado nutricional del paciente se relaciona con la aparición del evento de hepatotoxicidad. En estudios realizados en India, se ha descrito que aquellos pacientes que presentaban IMC muy bajos, relacionados a un estado de desnutrición, se relacionan con la aparición de hepatotoxicidad inducida por isoniacida (Ramappa & Aithal, 2013; Tirapegui & Peña, 2018). Para nuestro caso, se observa que cuando evaluamos el IMC con respecto a la media (Tabla N°15), obtenemos un dato interesante, un OR de riesgo de 4,50, con un *p-value* a punto de conseguir la significancia (0,050). Esto llama la atención, considerando que la media para nuestra

muestra fue un IMC de 24,22 kg/m², muy alejado a lo que se consideraría desnutrición, pero sí, cercano al rango que la organización mundial de la salud considera como sobrepeso (World Health Organization, WHO, 2020), ya que sobre un índice de 25 se considera al sujeto en esta condición. Si bien no nos encontramos dentro de este rango, hay que considerar que en otros países de Asia el sobrepeso se considera sobre 23, y que incluso la misma OMS recomienda mantenerse en un rango de IMC de 21 a 23 (WHO Expert Consultation, 2004; World Health Organization, Mean Body Mass Index (BMI), 2020). Además, la misma organización aclara que tanto la desnutrición como el sobrepeso y obesidad corresponden a casos de malnutrición, lo que podría relacionarse al por qué este factor presenta un riesgo mayor al presentarse sobre peso. Una de las razones por las que esto puede estar ocurriendo es principalmente al estrés oxidativo (Marseglia *et al*, 2015). Otra posible razón puede ser también el hecho de que la isoniazida es un fármaco moderadamente lipofílico (Piccaro *et al*, 2015), esto podría explicar el hecho de un mayor OR con mayor IMC, debido a que el fármaco tiende a acumularse más en los tejidos adiposos o adipocitos, y en el hígado se produciría mayor acumulación del fármaco en sujetos con sobrepeso u obesidad, lo que provocaría que el fármaco tenga más posibilidades de producir sus metabolitos hepatotóxicos. El hecho de que pese a tener un tamaño muestral tan pequeño, se consiguió un modelo cercano a la significancia, puede estar indicando que este factor se podría considerar de riesgo para la aparición de hepatotoxicidad y debiese ser evaluado con más estudios y con un mayor número de pacientes, para estudiar hasta qué punto se relaciona este factor con la aparición de la hepatotoxicidad e incluso su nivel de gravedad.

Para el factor consumo de alcohol no observamos significancia estadística, si bien en literatura se describe la importancia de este factor para la aparición de hepatotoxicidad, no se logró estudiar su consumo de manera adecuada para esta tesis. La razón se debe principalmente a que el dato del consumo de alcohol depende mucho de lo que el paciente responda a la enfermera a la hora de completar su ficha, ya que son poco precisos o no revelan datos sobre su ingesta. Esto hace difícil determinar efectivamente cuanto es el consumo de cada paciente, y catalogarlo como consumo moderado o alto, y si esto es posible relacionarlo con la aparición de la hepatotoxicidad. Sabemos que, según “Dietary Guidelines for Americans”, el consumo moderado de alcohol se define como el consumo de una copa al día para las mujeres y dos para los hombres (U.S. Department of Health and Human Services

and U.S. Department of Agriculture, 2015-2020), por lo que sería interesante conocer, de acuerdo con estas guías, cual es el real consumo del paciente, lo que permitiría determinar con mayor precisión que tan importante es el alcohol como factor a la hora de presentar hepatotoxicidad. Si bien no se ha reportado el mecanismo por el cual el alcohol aumenta este riesgo cuando se está en tratamiento con isoniacida, podría deberse al mismo metabolismo del alcohol y a lo que este por si solo produce en el hígado (Ding & Yang, 2019).

Para la variante genética rs1041983, es observamos que para los tres modelos de herencia obtuvimos OR de riesgo elevado para la aparición del evento de hepatotoxicidad, pero con un un intervalo de confianza más estrecho para el modelo de herencia dominante, indicando que el valor de OR (7,50) entregado es mucho más preciso, incluso con un tamaño muestral bajo. En el trabajo de Chan *et al* (2013), se obtuvo un OR de 5,72 para el mismo modelo, tenemos que considerar que esto fue realizado en una población singapurense. Si bien esta variante al encontrarse sola representa un fenotipo rápido debido a que corresponde a una mutación sinónima (Salazar-Granara *et al*, 2016).

Como se mencionó en la introducción, existen contradicciones con respecto a que fenotipo de acetilación es el que produce la hepatotoxicidad. En los últimos años, se han realizado al menos dos meta-análisis que comparan los estudios publicados hasta la fecha relacionados con el tipo de acetilador y la aparición de hepatotoxicidad, y se ha encontrado que, en su totalidad, aquellos estudios que dan cuenta de que el acetilador lento es el de riesgo es mayor, aunque también se discute que cada estudio analiza con diferentes metodologías, distintas poblaciones y distinto tamaño muestral (Zhang *et al*, 2018; Khan *et al*, 2019). Al respecto es interesante ver que la variante rs1041983 se relaciona, en nuestro caso, con un riesgo mayor a presentar hepatotoxicidad, pese a que cuando se presenta en solitario (como el haplotipo 6*A) se observa el fenotipo de acetilador rápido. Esto puede significar que esta variante se encuentra unida a otros polimorfismos en el gen, que representan un haplotipo lento, como podemos observar en aquellos haplotipos *5G, *5J, *6A, *6C, *6D, *7B, *14B, *14D y *14G en la tabla N°29 (Salazar-Granara *et al*, 2016). Dentro de aquellos haplotipos que presentan la variante rs1041983 y otras más que entregan un fenotipo lento, es debido principalmente a que los otros polimorfismos provocan un cambio aminoacídico que altera la forma o función de la proteína, lo que produce que la misma se produzca en menor

cantidad, que no sea lo suficientemente estable o quede truncada (Walraven *et al*, 2008; Hein, 2009; Rajasekaran *et al*, 2011).

Dentro de lo ya mencionado, en Jordania se realizó secuenciación del gen *NAT2* en un tamaño muestral de 68 individuos. Mediante desequilibrio de unión, determinaron que, para su muestra, el polimorfismo C282T (rs1041983) se encontraba asociado a T341C y C481T (Jarrar *et al*, 2017). Si observamos la tabla N°29, encontramos que el polimorfismo *NAT2**5G contiene a estos tres polimorfismos y corresponde a un fenotipo de acetilación lenta. Se debe tener en consideración que esto fue realizado en otra población con características genéticas diferentes a la local, por lo que en nuestro caso solo se podría comprobar la presencia de este haplotipo mediante secuenciación. Además, el uso de esta técnica nos permitiría observar la totalidad de los posibles SNP que se presenten, relacionarlos con los haplotipos estudiados e incluso, poder describir nuevos polimorfismos para nuestra población, tal como fue el caso de Brasil, que pudo describir nuevos SNPs para la enzima *NAT2* mediante esta técnica (Teixeira *et al*, 2010).

Tabla N°29: Alelos de NAT2 (haplotipos) que presentan el SNP C282T (rs1041983), cambio aminoacídico y fenotipo presentado

Alelo NAT2 (Haplotipo)	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Fenotipo
NAT2*5G	C282T	Y94Y*	Lento
	T341C	I114T	
	C481T	L161L*	
	A803G	K268R	
NAT2*5J	C282T	Y94Y*	Lento
	T341C	I114T	
	G590A	R197Q	
NAT2*6A	C282T	Y94Y*	Lento
	G590A	R197Q	
NAT2*6C	C282T	Y94Y*	Lento
	G590A	R197Q	
	A903G	K268R	
NAT2*6D	T111C	F37F*	Lento
	C282T	Y94Y*	
	G590A	R197Q	
NAT2*7B	C282T	Y94Y*	Lento
	G857A	G286E	
NAT2*12B	C282T	Y94Y*	Rápido
	A803G	K268R	
NAT2*13A	C282T	Y94Y*	Rápido
NAT2*14B	G191A	R64Q	Lento
	C282T	Y94Y*	
NAT2*14D	G191A	R64Q	Lento
	C282T	Y94Y*	
	G590A	R197Q	
NAT2*14G	G191A	R64Q	Lento
	C282T	Y94Y*	
	A803G	K268R	

Tabla adaptada de: Salazar-Granara, A., Youn-ho, K., & Figueroa-Tataje, J. Q.-C.-S. (2016). Frecuencia del polimorfismo 282 C>T (rs1041983) del gen N-Acetiltransferasa (NAT2) en poblaciones peruanas e implicancias en la salud. *Horizonte medico*, 16(1), 20-31. Con los datos de <http://louisville.edu/medicine/departaments/pharmacology/news-information/nat> *: Cambio sinónimo.

Esa fue también otra limitación importante del estudio, ya que, debido a no contar con presupuesto, equipamiento y preparación, esto no pudo llevarse a cabo. Como proyección, sería interesante poder secuenciar tanto a la población general chilena (los que se evaluaron en este trabajo), como a aquella población en estudio de este proyecto (pacientes).

Como primer paso para determinar la relación de este factor con el evento, podemos concluir que posiblemente existe una fuerte asociación de esta variante genética (con modelo de herencia dominante) y la aparición de hepatotoxicidad inducida por isoniacida. Esto podría abrir las puertas a más investigaciones y evaluaciones con miras a utilizar esta variante incluso como un marcador clínico para la aparición de hepatotoxicidad, evaluando a cada paciente al entrar al proyecto de TB si presenta o no el polimorfismo, y de acuerdo con lo mencionado, realizar un seguimiento con más énfasis en aquellos que si lo presentan, ya que pueden desarrollar un nivel de hepatotoxicidad, que, de no ser seguido, podría evolucionar a hepatitis.

Con respecto a lo que ocurre con la segunda variante en estudio, rs1799930, podemos ver que se obtuvo un OR de 2,85 para el genotipo GA, con un *p-value* de 0,173 (Tabla N°13) para el modelo de herencia codominante. Si bien se aleja de la significancia estadística a comparación de la otra variable estudiada, tal vez con un aumento del tamaño muestral se alcance esta, y, lo que es más importante, se encuentren sujetos con genotipo AA que permitan estudiar los demás modelos de herencia. Además, podemos ver a comparación de los resultados con la variante genética anterior, que el OR obtenido es menor, esto puede deberse principalmente a que ninguno de los sujetos estudiados presentó el genotipo AA, y puede que para que exista un efecto mayor en la alteración del fenotipo, tiene que estar presente en ambos alelos este polimorfismo. Para el estudio realizado por Chan *et al* (2013), se observa un OR de 2,16, pero para el modelo dominante, el cual no pudimos evaluar.

Diversos estudios han determinado que la presencia del genotipo AA como el haplotipo NAT2*6 correspondería a un fenotipo de acetilación ultra-lento (Ruiz *et al*, 2012; Selinski *et al*, 2013), por lo mismo, es que para poder concluir sobre el efecto que tiene esta variante sobre el evento que estudiamos, es crucial poder evaluarlo en una muestra que tenga individuos con este genotipo.

Se ha descrito en literatura mediante modelación y función de la proteína, que la presencia de este polimorfismo produce efectos en la proteína misma, debido a que el cambio del aminoácido arginina, que se encuentra cargado positivamente, al aminoácido glutamina que posee carga neutra, provoca que se pierdan interacciones electrostáticas de la proteína; además, se ha descrito que se reduce la actividad y los niveles de la proteína debido a que se produce una reducción de la termo estabilidad proteica (Hein D. W., 2009).

Para los primeros análisis de modelos multivariados, se estudiaron aquellos que presentaban ambas variantes genéticas. En estos casos nos alejamos de la significancia estadística, aunque si bien la Tabla N°16 entrega un resultado significativo para el modelo, la variante genética rs1799930 por si sola no. Esto puede deberse a lo explicado anteriormente, al no presentar el genotipo AA para esta variante, no podemos evaluar a cabalidad los demás modelos de herencia y desconocemos que es lo que ocurre realmente con este polimorfismo y la aparición de hepatotoxicidad en la población estudiada.

Para los modelos multivariados que analizan la presencia de las variantes con los factores no genéticos, el que más importancia tiene, por los datos entregados es el de la tabla N°17, esto debido a que nos entrega un *p-value* de 0,004 y un pseudo R^2 de 0,29, lo que significa que estos factores evaluados explican en un 29% el evento. Además de que cada factor presenta por sí mismo, *p-values* con significancia estadística o bien, cercanos a ella, como ocurre con la edad. Los OR que se presentaron para cada factor, fueron todos de riesgo, destacamos en ello a la variante genética y al IMC respecto a la media, donde obtuvimos OR de 11,83 y 9,44 respectivamente, indicando que el riesgo de que ocurra la hepatotoxicidad estando estos factores presentes es sumamente elevado, ya que en literatura encontramos que un OR sobre 6 se considera alto (Chen *et al*, 2010). Los factores IMC y edad, son de mucha más fácil obtención y con poco margen de error (a diferencia del consumo de alcohol), por lo que un modelo que considere la variante genética rs1041983, IMC mayor a 24,24 kg/m² y edad mayor a 45 años, nos puede permitir evaluar si existe un mayor riesgo o no, de que el evento de hepatotoxicidad ocurra. Debido a que la evaluación de estos factores en conjunto no ha sido llevada a cabo en otros estudios, no podemos realizar una comparación con la literatura encontrada.

4.4.2. Aumento de los niveles de GPT basales al doble

Por último, con respecto a la evaluación sobre el aumento individual de GPT con respecto a los propios valores basales de cada paciente, no se pudo observar ninguna relación que presentara una significancia importante para los modelos univariados, incluso para aquellos que evaluaban ambas variantes genéticas. Si bien para el caso del factor de edad mayor a 45 años y la variante genética rs1041983 presentan *p values* cercanos a la significancia, para comprobarlo habría que analizar estos factores en una cantidad de pacientes mayor. Debemos recordar que las características físicas de los individuos también influyen en sus propios niveles de GPT (Liu *et al*, 2014), por lo que estos resultados podrían estar indicándonos que el uso de isoniacida se relaciona más con la aparición de hepatotoxicidad que con el aumento de los niveles basales de GPT.

Para los multivariados, el modelo que más destaca es el que se muestra en la tabla N°26, donde obtuvimos un *p value* de 0,03 con un pseudo R^2 de 0,20. Para este, observamos que existe una relación de la variante rs1041983, IMC y edad con respecto a la media. Si bien es un modelo parecido al que se discutió en la sección anterior, podemos observar que este no presenta significancia estadística en los factores por separado, además de que los factores solo explican en un 20% el modelo, a diferencia del 29% del modelo anterior. Además, los OR entregados son mucho más bajos, por lo que la relación observada de estos factores no tiene tanto peso para el aumento de GPT basal inducido por isoniacida. Lamentablemente, esto no se ha estudiado anteriormente, por lo que no podemos relacionarlo con literatura, y observar si este es un comportamiento esperado o no. Sumado a lo mencionado, sabemos que la isoniacida produce un aumento de GPT, aunque no sea grave (Aguayo & Rodríguez, 2011), pero no conocemos la real comparativa de este aumento respecto a los niveles basales. Se propone realizar el mismo estudio con un tamaño muestral mayor, para realizar la comparación de cada individuo y el aumento de su nivel basal de GPT.

Por último, se debe mencionar que para nuestra población estudiada, no se evaluaron todos estos factores solo para los pacientes chilenos, porque si bien el estudio se lleva a cabo en el país, excluir a los extranjeros es omitir la situación actual de la tuberculosis en nuestra región, ya que el aumento de inmigrantes ha traído consigo también un aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad de esta enfermedad, principalmente debido a que los inmigrantes

vienen de países pobres donde la tuberculosis continúa siendo un problema grave de salud pública, sumado a la situación actual en la que viven en nuestro país, con pobreza y hacinamiento (Fica, Herrera, & Aguilera, 2019).

Esta tesis se estudió la relación de polimorfismos de NAT2 con la aparición de hepatotoxicidad inducida por isoniacida, dentro de ello, pudimos observar que la aparición de este evento corresponde a lo encontrado en la literatura, aunque debido a que no existe un consenso para determinar el daño hepático inducido por fármacos, pudieron quedar muchas variantes de lado. Aún así, pudimos encontrar una relación importante con la presencia de la variante genética rs1041983 y la aparición de hepatotoxicidad, además de encontrar un modelo multivariado relacionando esta variante con el IMC respecto a la media y la edad respecto a la media, entregando un 29% de relación de estos factores con la aparición del evento.

Se propone que, como proyección, este estudio continúe con el reclutamiento, aumentando el tamaño muestral, para corroborar estas relaciones ya encontradas e incluso, poder determinar otros factores de riesgo para la aparición de hepatotoxicidad.

5. Conclusiones

Mediante este estudio se evaluó aparición de hepatotoxicidad en el grupo de pacientes tratados con isoniacida. Se encontró que, dentro de los pacientes evaluados, un 32,43% de ellos presentó nivel de hepatotoxicidad grado 1 o superior. Por su parte, con respecto a la evaluación del aumento de GPT basal al doble, observamos que también un 32,43% del total presentó un aumento de sus valores basales.

Con respecto a la evaluación de la frecuencia de los polimorfismos estudiados, para el total de pacientes, observamos que la variante rs1041984 presentó una frecuencia alélica para el alelo T de 0,34, mientras que la variante rs1799930 presentó una frecuencia para el alelo A de 0,11, sin presentar sujetos con el genotipo AA. Por otra parte, el análisis realizado para los pacientes que solo eran de nacionalidad chilena, entregó una frecuencia para el alelo T de 0,33 para la variante genética rs1041984, y una frecuencia alélica para el alelo T de 0,17 para la variante rs1799930. Los datos de los extranjeros se alejan de lo observado en la población general chilena, por su parte, al solo evaluar a los chilenos existe un acercamiento a lo observado en la población general.

Por último, mediante regresiones logísticas univariadas y multivariadas, se evaluó la posible relación entre factores no genéticos y genéticos con la aparición de hepatotoxicidad, encontrando una significancia importante para la variante genética rs1041983 como modelo de herencia dominante, y se encontró además que en modelo multivariado, para los factores edad mayor a 45 años, IMC mayor a 24,24 kg/m² y variante genética rs1041983 modelo de herencia dominante, se presenta un pseudo R² de 0,29, lo que significa que todas estas variantes juntas relacionadas con el evento hepatotoxicidad explican en un 29% el modelo.

Este trabajo está considerando como una primera aproximación al tema en el país, y a pesar que razones externas y de gran envergadura afectaron directamente el tamaño muestral, impactando en los hallazgos, estos resultados preliminares y el desarrollo metodológico puede servir de guía o de orientación a futuros estudios mayores sobre la materia.

6. Referencias

- 1000 Genomes Project Consortium. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, *491*(7422), 56-65. doi:10.1038/nature11632
- Acuña, P. M., Llop, R. E., & Rothhammer, E. F. (2000). Genetic composition of rural Chilean communities inhabiting Elqui, Limari and Choapa valleys. *Revista médica de Chile*, *128*(6), 598-600. doi:10.4067/S0034-98872000000600004
- Adhvaryu, M. R., Reddy, N., & Vakharia, B. C. (2008). Prevention of hepatotoxicity due to anti tuberculosis treatment: a novel integrative approach. *World journal of gastroenterology*, *14*(30), 4753-4762. doi:10.3748/wjg.14.4753
- AFP. (2019, Octubre 27). *T13*. Retrieved from <https://www.t13.cl/noticia/nacional/lacronologia-del-estallido-social-chile-segun-agencia-afp>
- Aguayo, M., & Rodríguez, J. C. (2011). Hígado y terapia antituberculosa. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, *27*, 53 - 57.
- Aklillu, E., Carrillo, J., Makonnen, E., Bertilsson, L., & Djordjevic, N. (2018). N-Acetyltransferase-2 (NAT2) phenotype is influenced by genotype-environment interaction in Ethiopians. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *74*(7), 903-911. doi:10.1007/s00228-018-2448-y
- Al-Koofee, D., & Mubarak, S. (2019). Genetic polymorphisms. In *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms* (pp. 1 - 10).
- Arnaiz-Villena, A., Parga-Lozano, C., Moreno, E., Areces, C., Rey, D., & Gomez-Prieto, P. (2010). The Origin of Amerindians and the Peopling of the Americas According to HLA Genes: Admixture with Asian and Pacific People. *Current Genomics*, *11*(2), 103–114.
- Boshoff, H. I., Mizrahi, V., & Barry, C. E. (2002). Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *Journal of Bacteriology*, *184*(8), 2167-2172. doi:10.1128/jb.184.8.2167-2172.2002
- Boukouvala, S., & Sim, E. (2005). Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts. *Basic & clinical pharmacology and toxicology*, *96*(5), 343-351. doi:10.1111/j.1742-7843.2005.pto_02.x
- Butcher, N., Boukouvala, S., Sim, E., & Minchin, R. F. (2002). Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *The pharmacogenomics journal*, *2*, 30-42. doi:10.1038/sj.tpj.6500053
- Chan, S. L., Chua, A., Aminkeng, F., Chee, C., Jin, S., Loh, M., . . . Brunham, L. R. (2017). Association and clinical utility of NAT2 in the prediction of isoniazid-induced liver injury in Singaporean patients. *Plos one*, *12*(10), 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0186200

- Chen, H., Cohen, P., & Chen, S. (2010). How Big is a Big Odds Ratio? Interpreting the. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 39, 860-864. doi: 10.1080/03610911003650383
- Connolly, L. E., Edelstein, P. H., & Ramakrishnan, L. (2007). Why Is Long-Term Therapy Required to Cure Tuberculosis. *PLoS Medicine*, 4(3), 0435-0442. doi:10.1371/journal.pmed.0040120
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of micobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectuos Diseases*, 5(1).
- Deng, L., Mikusová, K., Robuck, K. G., Scherman, M., Brennan, P. J., & McNeil, M. R. (1995). Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 694-701. doi:10.1128/aac.39.3.694
- Ding, W. X., & Yang, L. (2019). Alcohol and drug-induced liver injury: Metabolism, mechanisms, pathogenesis and potential therapies. *Liver research*, 3(3-4), 129-131. doi:10.1016/j.livres.2019.11.006
- Djordjevic, N., Carrillo, J. A., Ueda, N., Gervasini, G., Fukasawa, T., Suda, A., . . . Aklillu, E. (2011). N-Acetyltransferase-2 (NAT2) gene polymorphisms and enzyme activity in Serbs: unprecedented high prevalence of rapid acetylators in a White population. *Journal of clinical pharmacology*, 51(7), 994-1003. doi:10.1177/0091270010377630
- Doll, M. A., Salazar-González, R. A., Bodduluri, S., & Hein, D. W. (2017). Arylamine N-acetyltransferase 2 genotype-dependent N-acetylation of isoniazid in cryopreserved human hepatocytes. *Acta pharmaceutica sinica B*, 7(4), 517-522. doi:10.1016/j.apsb.2017.05.003
- Donald, P. R., & Schaaf, H. S. (2011). Isoniazid pharmacokinetics and efficacy in adults and children. 40, 25-31. doi:10.1159/000323628
- Eyheramendy, S., Martinez, F. I., Manevy, F., Vial, C., & Repetto, G. M. (2015). Genetic structure characterization of Chileans reflects historical immigration patterns. *Nature communications*, 6, 1-10. doi:10.1038/ncomms7472
- Farga, V., & Peña, C. (2019). Situación epidemiológica de la tuberculosis en Chile en el escenario global 2018. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*(35), 63-70.
- Feng, F. M., Guo, M., Chen, Y., Li, S. M., Zhang, P., Sun, S. F., & Zhang, G. S. (2014). Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced hepatic injury. *Genetics and molecular research : GMR*, 13(4), 9463-9471. doi:10.4238/2014.November.11.11
- Fernandes, G., Salgado, H., & Santos, J. (2017). Isoniazid: A Review of Characteristics, Properties and Analytical Methods. *Critical reviews in analytical chemistry*, 47(4), 298-308. doi:10.1080/10408347.2017.1281098

- Fica, A., Herrera, T., & Aguilera, X. (2019). El deterioro de la tuberculosis en Chile. *Revista médica de Chile*, *147*, 1042-1052.
- Fricke-Galindo, I., Jung-Cook, H., Llerena, A., & López-López, M. (2018). Farmacogenética de reacciones adversas a fármacos antiepilépticos. *Neurología*, *33*(3), 165-176.
- García-Martín, E. (2008). Interethnic and intraethnic variability of NAT2 single nucleotide polymorphisms. *Current drug metabolism*, *9*(6), 487-497. doi:10.2174/138920008784892155
- Gnecchi-Ruscione, G. A., Sarno, S., De Fanti, S., Gianvincenzo, L., Giuliani, C., Boattini, A., Pettener, D. (2019). Dissecting the Pre-Columbian Genomic Ancestry of Native Americans along the Andes-Amazonia Divide. *Molecular biology and evolution*, *36*(6), 1254–1269. doi:10.1093/molbev/msz066
- Gronhagen-Riska, C., Hellstrom, P. E., & Froseth, B. (1978). Predisposing factors in hepatitis induced by isoniazid-rifampin treatment of tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, *118*, 461-467.
- Guaoua, S., Ratbi, I., Laarabi, F. Z., Elalaoui, S. C., Jaouad, I. C., Barkat, A., & Sefiani, A. (2014). Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population. *BMC genetics*, *15*(156). doi:10.1186/s12863-014-0156-x
- Guio, H., Levano, K. S., Sánchez, C., & Tarazona, D. (2015). Rol de la farmacogenómica en el régimen de tratamiento de tuberculosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, *32*(4), 794-800.
- Gupta, V. H., Amrapurkar, D. N., Singh, M., Sasi, P., Joshi, J. M., Baijal, R., . . . Wangikar, P. P. (2013). Association of N-acetyltransferase 2 and cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Western India. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *28*(8), 1368-1374. doi:10.1111/jgh.12194
- Hein, D. W. (2009). N-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, *5*(4), 353-366. doi:10.1517/17425250902877698
- Hein, D. W., Doll, M. A., Fretland, A. J., Leff, M. A., Webb, S. J., Xiao, G. H., . . . Feng, Y. (2000). Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*, *9*(1), 29-42.
- Herrera, T., Lepe, R., Yáñez, A., Martínez, C., Zúñiga, M., & Peña, C. (2015). *Manual de Organización y Procedimientos del Programa Nacional de Control y Eliminación de la Tuberculosis*. Ministerio de Salud, Chile.
- Huaman, M. A., & Sterling, T. R. (2019). Treatment of Latent Tuberculosis Infection - An Update. *Clinics in Chest Medicine*, *40*(4), 839-848. doi:10.1016/j.ccm.2019.07.008

- Huang, Y. S. (2014). Recent progress in genetic variation and risk of antituberculosis drug-induced liver injury. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 77(4), 169-173. doi:10.1016/j.jcma.2014.01.010
- Husain, A., Zhang, X., Doll, M. A., States, J. C., Barker, D. F., & Hein, D. W. (2007). Identification of N-acetyltransferase 2 (NAT2) transcription start sites and quantitation of NAT2-specific mRNA in human tissues. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35(5), 721-727. doi:10.1124/dmd.106.014621
- Institute of Medicine (US). (2012). Recruitment Challenges in Clinical Trials for Different Diseases and Conditions. In *Public Engagement and Clinical Trials: New Models and Disruptive Technologies: Workshop Summary*. Washington (DC): National Academies Press (US). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92105/>
- Jarrar, Y. B., Balamesh, A. A., & Jarrar, W. (2017). Sequence analysis of the N-acetyltransferase 2 gene (NAT2) among Jordanian volunteers. *Libyan Journal of Medicine*, 13, 1-9. doi:10.1080/19932820.2017.1408381
- Judge, V., Narasimhan, B., & Ahuja, M. (2012). Isoniazid: the magic molecule. *Medicinal Chemistry Research*, 21, 3940-3957. doi:10.1007/s00044-011-9948-y
- Kadam, R. A., Borde, S. U., Madas, S. A., Salvi, S. S., & Limaye, S. S. (2016). Challenges in recruitment and retention of clinical trial subjects. *Perspectives in clinical research*, 7(3), 137-143. doi:10.4103/2229-3485.184820
- Kaliyaperumal, K., Grove, J. I., Delahay, R. M., Griffiths, W. J., Duckworth, A., & Aithal, G. P. (2018). Pharmacogenomics of drug-induced liver injury (DILI): Molecular biology to clinical applications. *Journal of Hepatology*, 69, 948-957.
- Khan, N., Pande, V., & Das, A. (2013). NAT2 sequence polymorphisms and acetylation profiles in Indians. *Pharmacogenomics*, 14(3), 289-303. doi:10.2217/pgs.13.2
- Khan, S., Mandal, R. K., Elsbali, A. M., Dar, S. A., Jawed, A., Wahid, M., . . . Haque, S. (2019). Pharmacogenetic association between NAT2 gene polymorphisms and isoniazid induced hepatotoxicity: trial sequence meta-analysis as evidence. *Bioscience Reports*, 39(1). doi:10.1042/BSR20180845
- Klein, D. J., Boukouvala, S., McDonagh, E. M., Shuldiner, S. R., Laurieri, N., Thorn, C. F., . . . Klein, T. E. (2016). PharmGKB Summary: Isoniazid Pathway, Pharmacokinetics (PK). *Pharmacogenetics and Genomics*, 26(9), 436-444. doi:10.1097/FPC.0000000000000232
- Kopanoff, D. E., Snider, J. R., & Caras, G. J. (1978). Isoniazid-related hepatitis. *American Review of Respiratory Disease*, 117, 991 - 1001.

- Lee, S. Y., Lee, K. A., Ki, C. S., Kwon, O. J., Kim, H. J., Chung, M. P., . . . Kim, J. W. (2002). Complete sequencing of a genetic polymorphism in NAT2 in the Korean population. *Clinical chemistry*, *48*(5), 775-777.
- Liu, L., Von Vett, A., Zhang, N., Walters, J. J., Wagner, C. R., & Hanna, P. E. (2007). Arylamine N-acetyltransferases: characterization of the substrate specificities and molecular interactions of environmental arylamines with human NAT1 and NAT2. *Chemical research in toxicology*, *20*(9), 1300-1308. doi:10.1021/tx7001614
- Liu, Z., Que, S., Xu, J., & Peng, T. (2014). Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: A review. *International Journal of Medical Sciences*, *11*(9), 925-935. doi:10.7150/ijms.8951
- LiverTox, Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver injury. (2012). *ncbi*. Retrieved Noviembre 2018, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>
- Lozano, J. A. (2002). Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Offarm*, *21*(8), 102-110.
- Lv, X., Tang, S., Xia, Y., Zhang, Y., Wu, S., Yang, Z., . . . Zhan, S. (2012). NAT2 genetic polymorphisms and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese community population. *Annals of hepatology*, *11*(5), 700-707.
- Marra, F., Marra, C. A., Bruchet, N., Richardson, K., Moadebi, S., Elwood, R. K., & FitzGerald, J. M. (2007). Adverse drug reactions associated with first-line anti-tuberculosis drug regimens. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, *11*(8), 868-875.
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., . . . Arrigo, T. (2015). Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *International journal of molecular science*, *16*, 378 - 400.
- Mathieson, I., & Scally, A. (2020). What is ancestry? *Plos Genetics*, *16*(3), 1 - 6. doi:10.1371/journal.pgen.1008624
- Matson, G., Sutton, H., Swanson, J., & Robinson, A. (1966). Distribution of hereditary blood groups among Indians in South America. II. In Peru. *American Journal of Physical Anthropology*, *24*, 325-349.
- McDonagh, E. M., Boukouvala, S., Aklillo, E., Hein, D. W., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2014). PharmGKB summary: very important pharmacogene information for N-acetyltransferase 2. *Pharmacogenetics and genomics*, *24*(8), 409-425. doi:10.1097/FPC.0000000000000062
- Metushi, I., Utrecht, J., & Phillips, E. (2016). Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *British journal of clinical pharmacology*, *81*(6), 1030-1036. doi:10.1111/bcp.12885

- Meyer, U. A., & Zanger, U. M. (1997). Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 269-296. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.269
- Mini, E., & Nobili, S. (2009). Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. , 6(1). *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 6(1), 17-24.
- Ministerio de Salud. (2020, Marzo 3). *Minsal*. Retrieved from <https://www.minsal.cl/ministerio-de-salud-confirma-primer-caso-de-coronavirus-en-chile/>
- Mitchell, J. R., Thorgeirsson, U. P., Black, M., Timbrell, J. A., Snodgrass, W. R., Potter, W. Z., . . . Keiser, H. R. (1975). Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydranize metabolites. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 18(1), 70-79. doi:10.1002/cpt197518170
- Mitchell, J. R., Zimmerman, H. J., Ishak, K. G., Thorgeirsson, U. P., Timbrell, J. A., & Snodgrass, W. R. (1976). Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Annals of Internal Medicine*, 84, 181-192. doi:10.7326/0003-4819-84-2-181
- Mitchison, D. (2005). The Diagnosis and Therapy of Tuberculosis During the Past 100 Years. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(7), 699-706. doi:10.1164/rccm.200411-1603OE
- Murray, P. R., Rosenthal, K., & Pfaller, M. A. (2016). *Medical microbiology*. Philadelphia: Elsevier.
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., . . . Ravigliione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature reviews. Disease primers.*, 2, 1-23. doi:10.1038/nrdp.2016.76
- Pandey, A. K., Bajpai, A., Baboo, V., & Dwivedi, A. (2014). Structural, Electronic, and Vibrational Properties of Isoniazid and Its Derivative N-Cyclopentylidenepyridine-4-carbohydrazide: A Quantum Chemical Study. *Journal of Theoretical Chemistry*, 2014, 1-15. doi:10.1155/2014/894175
- Patillon, B., Luisi, P., Poloni, E. S., Boukouvala, S., Darlu, P., Genin, E., & Sabbagh, A. (2014). A Homogenizing Process of Selection Has Maintained an “Ultra-Slow” Acetylation NAT2 Variant. *Human Biology*, 86(3), 185-214. doi:10.13110/humanbiology.86.3.0185
- Perwitasari, D. A., Atthobari, J., & Wilffert, B. (2015). Pharmacogenetics of isoniazid-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*, 47(2), 222-228. doi:10.3109/03602532.2014.984070

- PharmGKB. (n.d.). *Clinical annotations NAT2*. Retrieved marzo 2020, from <https://www.pharmgkb.org/gene/PA18/clinicalAnnotation>
- Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanism of Disease.*, 7, 353-384. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132458
- Piccaro, G., Poce, G., Biava, M., Giannoni, F., & Fattorini, L. (2015). Activity of lipophilic and hidrophilic drugs against dormant and replicating Mycobacterium tuberculosis. *The journal of antibiotics*, 68, 711-714. doi:10.1038/ja.2015.52
- Pirmohamed, M. (2001). Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *British journal of clinical pharmacology*, 52(4), 345-347. doi:10.1046/j.0306-5251.2001.01498.x
- Rajasekaran, M., Abirami, S., & Chen, C. (2011). Effects of single nucleotide polymorphisms on human N-acetyltransferase 2 structure and dynamics by molecular dynamics simulation. *PloS one*, 6(9), e25801. doi:10.1371/journal.pone.0025801
- Ramachandran, G., & Swaminathan, S. (2012). Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 5, 89-98. doi:10.2147/PGPM.S15454
- Ramappa, V., & Aithal, G. P. (2013). Hepatotoxicity Related to Anti-tuberculosis Drugs: Mechanisms and Management. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 3(1), 37-49. doi:10.1016/j.jceh.2012.12.001
- Robin, S. W. (2015). Testing for Hardy-Weinberg Proportions: Have we lost the plot? *Journal of heredity*, 106(1), 1-19. doi:10.1093/jhered/eso062
- Rocco, P., Morales, C., Moraga, M., Miquel, J. F., Nervi, F., Llop, E., . . . Rothhammer, F. (2002). Composición genética de la población chilena: Distribución de polimorfismos de DNA mitocondrial en grupos originarios y en la población mixta de Santiago. *Revista médica de Chile*, 130(2), 125-131. doi:10.4067/S0034-98872002000200001
- Roy, P. D., Majumder, M., & Roy, B. (2008). Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics*, 9(3), 311-321. doi:10.2217/14622416.9.3.311
- Ruff, C. T. (2018). Pharmacogenetics of warfarin therapy. *Clinical Chemistry*, 64(11), 1558-1559.
- Ruiz, J. D., Martínez, C., Anderson, K., Gross, M., Lang, N. P., García-Martín, E., & Agúndez, J. A. (2012). The differential effect of NAT2 variant alleles permits refinement in phenotype inference and identifies a very slow acetylation genotype. *PloS One*, 7(9). doi:10.1371/journal.pone.0044629
- Saktiawati, A., Sturkenboom, M., Stienstra, Y., Subronto, Y., & Kosterink, S. (2016). Impact of food on the pharmacokinetics of first-line anti-TB drugs in treatment-naive TB patients: a randomized cross-over trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 703-710. doi:10.1093/jac/dkv394

- Salazar-Granara, A., Youn-ho, K., Figueroa-Tataje, J., Quijano, F., Ore-Chavéz, D., & Sandoval-Sandoval, J. (2016). Frecuencia del polimorfismo 282 C>T del gen N-Acetiltransferasa (NAT2) en poblaciones peruanas e implicancias en la salud. *Horizonte medico*, *16*(1), 20-31.
- Santos, N. P., Callegari-Jacques, S. M., Ribeiro Dos Santos, A. K., Silva, C. A., Vallinoto, A. C., Fernandes, D. C., . . . Hutz, M. H. (2013). N-acetyl transferase 2 and cytochrome P450 2E1 genes and isoniazid-induced hepatotoxicity in Brazilian patients. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, *17*(4), 499-504. doi:10.5588/ijtld.12.0645
- Saukkonen, J. J., Cohn, D. L., Jasmer, R. M., Schenker, S., Jereb, J. A., Nolan, C. M., . . . Society), A. (. (2006). An Official ATS Statement: Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *174*(8), 935-952. doi:10.1164/rccm.200510-1666ST
- Schaberg, T., Rebhan, K., & Lode, H. (1996). Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. *European Respiratory Journal*, *9*(10), 2026-2030. doi:10.1183/09031936.96.09102026. PMID: 8902462.
- Selinski, S., Blaszkewicz, M., Ickstadt, K., Hengstler, J. G., & Golka, K. (2013). Refinement of the prediction of N-acetyltransferase 2 (NAT2) phenotypes with respect to enzyme activity and urinary bladder cancer risk. *Archives of Toxicology*, *87*, 2129-2139. doi:10.1007/s00204-013-1157-7
- Taja-Chayeb, L., Agúndez, J. A., Miguez-Muñoz, C., Chavez-Blanco, A., & Dueñas-Gonzalez, A. (2012). Arylamine N-acetyltransferase 2 genotypes in a Mexican population. *Genetics and Molecular Research*, *11*(2), 1082-1092. doi:10.4238/2012.April.27.7
- Teixeira, R. L., Morato, R. G., Cabello, P. H., Muniz, L. M., Moreira, A., Kritski, A. L., . . . Santos, A. R. (2011). Genetic polymorphisms of NAT2, CYP 2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(6), 716-724. doi:10.1590/s0074-02762011000600011
- Teixeira, R. L., Silva, F. P., Silveira, A. R., Cabello, P. H., Mendonça-Lima, L., Rabahi, M. F., . . . Santos, A. R. (2010). Sequence analysis of NAT2 gene in Brazilians: identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. *Mutation research*, *683*(1-2), 43-49. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.10.009
- Teixeira, R., Pires, M., Noel, P., & Rezende, A. (2013). Tuberculosis pharmacogenetics: State of the art. In B. H. Mahoub, *Tuberculosis-Current Issues in Diagnosis and Management* (pp. 105-126). IntechOpen. doi:10.5772/54984

- Tirapegui, F., & Peña, C. (2018). Factores de riesgo asociados a reacción adversa hepática por fármacos de primera línea contra *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, *34*, 62 - 69.
- U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. (2015-2020). *Dietary Guidelines for Americans* (8va edición ed.). doi: <https://health.gov/our-work/food-and-nutrition/2015-2020-dietary-guidelines/>
- Vademecum. (2020, Marzo 12). *Vademecum.es*. Retrieved from Isoniazida: <https://www.vademecum.es/principios-activos-isoniazida-J04AC01>
- Vilchèze, C., Wanf, ..., & Arai, M. (2006). Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid. *Nature Medicine*, *12*, 1027-1029. doi:10.1038/nm1466
- Walker, K., Ginsberg, G., Hattis, D., Johns, D. O., Guyton, K. Z., & Sonawane, B. (2009). Genetic polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, *12*(5-6), 440-472. doi:10.1080/10937400903158383
- Walraven, J. M., Zang, Y., Trent, J. O., & Hein, D. W. (2008). Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Current drug metabolism*, *9*(6), 471-486. doi:10.2174/138920008784892065
- Wang, H., Vath, G. M., Gleason, K. J., Hanna, P. E., & Wagner, C. R. (2004). Probing the mechanism of hamster arylamine N-acetyltransferase 2 acetylation by active site modification, site-directed mutagenesis, and pre-steady state and steady state kinetic studies. *Biochemistry*, *43*(25), 8234-8246. doi:10.1021/bi0497244
- Wang, P., Pradhan, K., Zhong, X. B., & Ma, X. (2016). Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta pharmaceutica Sinica B*, *6*(5), 384-392. doi:10.1016/j.apsb.2016.07.014
- Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K., & Staehelin, M. (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *61*(2), 667-673. doi:10.1073/pnas.61.2.667
- WHO, Expert consultation. (2004). Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*, *363*(9403), 157 - 163. doi:10.1016/S0140-6736(03)15268-3
- World Health Organization, W. (1992). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: medicamentos utilizados en las enfermedades micobacterianas. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38903>
- World Health Organization, WHO. (2012). Tuberculosis laboratory biosafety manual. [Place of publication not identified]: World Health Organization.
- World Health Organization, WHO. (2019). Global Tuberculosis Report 2019. 1-2.

- World Health Organization, WHO. (2020). *Mean Body Mass Index (BMI)*. Retrieved octubre 08, 2020, from https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/
- Wurwitz, N. (1969). Predisposing factors in adverse reactions to drugs. *British Medical Journal*, *1*, 536.
- Xiang, Y., Ma, L., Wu, W., Liu, W., Li, Y., Zhu, X., . . . Xin, X. (2014). 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*, *gstml* and *gstt1*. *PLoS one*, *9*(1), e85905. doi:10.1371/journal.pone.0085905
- Yamamoto, T., Suou, T., & Hirayama, C. (1986). Elevated serum aminotransferase induced by isoniazid in relation to isoniazid acetylator phenotype. *Hepatology*, *6*(2), 295-298. doi:10.1002/hep.1840060223
- Yee, D., Valiquette, C., Pelletier, M., Parisien, I., Rocher, I., & Menzies, D. (2003). Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *167*(11), 1472-1477. doi:10.1164/rccm.200206-626OC. Epub 2003 Jan 31. PMID: 12569078.
- Zabost, A., Brzezińska, S., Kozińska, M., Błachnio, M., Jagodziński, J., Zwolska, Z., & Augustynowicz-Kopeć, E. (2013). Correlation of N-acetyltransferase 2 genotype with isoniazid acetylation in Polish tuberculosis patients. *BioMed research international*, *5*-10. doi:10.1155/2013/853602
- Zha, B. S., & Nahid, P. (2019). Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, *40*(4), 763-774. doi:10.1016/j.ccm.2019.07.006
- Zhang, M., Wang, S., Wilffert, B., Tong, R., van Soolingen, D., van den Hof, S., & Alffenaar, J. W. (2018). The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti-TB treatment: a systematic review and meta-analysis. *British journal of clinical pharmacology*, *84*(12), 2747-2760. doi:10.1111/bcp.13722
- Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., Zhang, H., & Sun, Z. (2003). Mode of action of pirazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(5), 790-795. doi:10.1093/jac/dkg446
- Zhou, X., Ma, Z., Dong, D., & Wu, B. (2013). Arylamine N-acetyltransferases: a structural perspective. *British journal of pharmacology*, *169*(4), 748-760. doi:10.1111/bph.12182

ANEXO N°1

Consentimiento informado

ESTUDIO CQF-EC-001-18



HOJA DE CONSENTIMIENTO

N° Interno: CC- _____

21 SET. 2018

Fecha: ___/___/___

Yo..... RUT:.....

He sido invitado(a) a participar como voluntario(a) en el proyecto de investigación titulado **"BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS DE HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR ISONIACIDA EN PACIENTES CON TRATAMIENTO DE TUBERCULOSIS ACTIVA O LATENTE"** dirigido por los Doctores Luis Quiñones y Carlos Peña.

He leído y comprendido la información entregada para mi consentimiento informado, y se me han explicado todas mis dudas, por lo tanto:

Indique: SI o NO	Aspectos o ámbitos
	Conozco y entiendo el OBJETIVO del estudio.
	Comprendo y acepto los PROCEDIMIENTOS a los cuales debo someterme.
	Conozco los posibles RIESGOS y BENEFICIOS asociados a mi participación en este estudio.
	Acepto los resguardos sobre la CONFIDENCIALIDAD de mis datos personales, resultados médicos, análisis clínicos de laboratorio.
	Estoy totalmente informado sobre la VOLUNTARIEDAD de mi participación en este estudio, y completamente consciente de la posibilidad de retirarme del estudio si yo así lo determino.
	He sido instruido sobre mi DERECHO a consultar cualquier duda referente al presente estudio y de retirarme del estudio si yo así lo determino.

Leído y entendido el presente consentimiento, accedo a participar como voluntario en este estudio, firmando el presente documento.

Firma Voluntario	Firma Investigador Principal o Clínico	Firma responsable de la toma del C.I.	Firma Director (a) del Centro o delegado

**Esta investigación fue evaluada y aprobada en sus aspectos éticos y científicos, en caso de dudas sobre sus derechos favor consultar a las siguientes instituciones:
-Comité de ética de la investigación científica (CEC) del servicio de salud metropolitano central (SSMC), Dr. Emiliano Soto Romo, presidente del Comité de Ética del SSMC, ubicado en Victoria Subercaseux 381, 4° piso, teléfonos Fono: 225746943 o 225743520.225758506.*

ANEXO N°2

Autorización del comité de ética del SSMC



MINISTERIO DE SALUD
SERVICIO DE SALUD M. CENTRAL
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
Teléfono: 25746958.5743520
ESR/CGNS/matv
(Acta N°91/1 N°607/2018)

CERTIFICADO

DR. EMILIANO SOTO ROMO, en calidad de Presidente del Comité Ético-Científico (CEC) del Servicio de Salud Metropolitano Central, constituido por resolución exenta N°1303 de fecha 26 de septiembre del 2002 de la Dirección de dicho Servicio y Re-Acreditado por la SEREMI-RM mediante Resolución N° 009455 del 04 de Mayo del 2018, certifica que en sesión expedita del día 08 de agosto de 2018, el CEC SSMC acusa recibo de carta fechada 30 de Julio del 2018 y recibida el 02 de Agosto del 2018, a través de oficina de parte, del **Dr. Carlos Peña Mantinetti**, Jefe de la Unidad Broncopulmonar del Hospital Clínico San Borja Arriarán (HCSBA) y Jefe del Programa de Tuberculosis del Servicio de Salud Metropolitano Central (SSMC), **quien informa que está en conocimiento de la solicitud de aprobación al CEC-SSMC del estudio denominado: "Biomarcadores farmacogenéticos de hepatotoxicidad inducida por Isoniacida en pacientes con tratamiento de tuberculosis activa o latente"**, que se desarrollará en el HCSBA y en el cual participará como investigador clínico, declarando no tener conflicto de interés con el tema a desarrollar.

El CEC-SSMC informa al investigador, que dicha carta será incorporada al archivo del estudio, una vez que sea analizado en la reunión plenaria, a la que fue invitado mediante correo electrónico el 07 de Agosto del 2018.

Se adjunta copia de carta enviada por el investigador, firmada, fechada y timbrada.

La sesión expedita de fecha 08 de agosto de 2018, contó con la presencia de: Dr. Rafael Mendizabal Rodríguez, Sra. Victoria Soto, Sra. C. Gloria Notario Sánchez y Dr. Emiliano Soto Romo.


E.U. C. GLORIA NOTARIO SANCHEZ
SECRETARIA EJECUTIVA CEC

SANTIAGO, 2018
Dirección Servicio de Salud Metropolitano Central
Victoria Subsecretaría #381, Santiago, Chile




DR. EMILIANO SOTO ROMO
PRESIDENTE CEC
SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO CENTRAL