

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



Asociación de los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 del gen *SLCO1B1* y la susceptibilidad al desarrollo de daño hepático en pacientes del noreste de México con tuberculosis pulmonar con tratamiento estándar de primera línea.

Por

L.B.G. OSCAR ARTURO RAMOS SILVA

Como requisito parcial para obtener el grado de:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA

Enero, 2023

A

Asociación de los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 del gen *SLCO1B1* y la susceptibilidad al desarrollo de daño hepático en pacientes del noreste de México con tuberculosis pulmonar con tratamiento estándar de primera línea.

No. De Folio: FARMC-17508-MLYG-21/02



Alumno: Oscar Arturo Ramos Silva

Matrícula: 1717875

Programa académico

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento

Estudio de Compuestos con Actividad Farmacológica y Biotecnología Farmacéutica



Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez  
Directora de tesis



Dra. Beatriz Silva Ramírez  
Directora externa

Laboratorio de Inmunogenética del Centro De Investigación Biomédica Del Noreste  
IMSS

División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas UANL

## RESUMEN

Oscar Arturo Ramos Silva

Fecha de graduación: Enero 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del estudio:** Asociación de los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 del gen *SLCO1B1* y la susceptibilidad al desarrollo de daño hepático en pacientes del noreste de México con tuberculosis pulmonar con tratamiento estándar de primera línea.

**Número de páginas:** Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Farmacia.

**Área de estudio:** Compuestos con Actividad Farmacológica y Biotecnología Farmacéutica.

**Propósito y Método del Estudio:** El tratamiento de primera línea contra la tuberculosis puede llevar al paciente al desarrollo de efectos adversos graves. La hepatotoxicidad es uno de ellos que promueve el fracaso del control a la infección y más aún puede causar la muerte del paciente por falla hepática. La variabilidad genética en los individuos contribuye a la respuesta diferencial a determinados fármacos. En algunas poblaciones en especial la asiática los haplotipos que conforman las variantes tipo SNP's rs2306283 y rs4149056 del gen *SLCO1B1* se han encontrado asociadas al desarrollo de toxicidad hepática promovida por rifampicina. Estudiamos una población de 247 pacientes mexicanos con tuberculosis pulmonar (TBP), de los cuales 7 pacientes desarrollan hepatotoxicidad, para buscar una probable asociación entre las variantes y la complicación. La genotipificación de las variantes se realizó mediante discriminación alélica con sondas TaqMan por PCR en tiempo real. El cálculo de las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotipos, el equilibrio de Hardy-Weinberg, Desequilibrio de enlace y la medida de la asociación por OR se calculó con los programas con los SNPstas y SHEsis. Las diferencias se consideraron significativas cuando la  $P < 0.05$ . De igual manera se realizó regresión lineal simple para determinar la relación entre las variantes genéticas y las epidemiológicas. Para el estudio de las interacciones moleculares entre la rifampicina y los SNP's se efectuaron estudios *in-silico* de dinámica molecular.

**Contribuciones y Conclusiones:** Nuestro trabajo es el primero que se realiza sobre el tema en población del NE del país. El resultado de las diferencias entre las poblaciones con TBP con y sin desarrollo de hepatotoxicidad y las variantes tipo SNP's rs2306283 y rs4149056 del gen *SLCO1B1*, resultaron no significativas de igual forma no se determinó una relación significativa entre las variables epidemiológicas y el desarrollo de hepatotoxicidad. Los estudios *in-silico* de acoplamiento molecular (Docking) no mostraron cambios en la energía de unión entre el fármaco y la proteína transportadora *SLCO1B1* con y sin las variantes rs2306283 (Val174Ala) y rs4149056 (Asn130Asp).

Este reporte documenta que las variantes rs2306283 y rs4149056 del gen *SLCO1B1*, pueden no estar implicadas en la hepatotoxicidad por rifampicina. El estudio de otras variantes del gen debe ser estudiadas en forma adicional para valorar su efecto en el daño hepático.

**FIRMA DEL ASESOR:**

Asociación de los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 del gen *SLCO1B1* y la susceptibilidad al desarrollo de daño hepático en pacientes del noreste de México con tuberculosis pulmonar con tratamiento estándar de primera línea.

**Aprobación de la Tesis:**

---

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez  
**Directora de Tesis**

---

Dra. Beatriz Silva Ramírez  
**Codirectora de Tesis**

---

Dr. Omar González Santiago  
**Comité tutorial**

---

Dra. Ma. Del Rosario González González  
**Comité tutorial**

---

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza  
**Comité tutorial**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las doctoras Beatriz Silva Ramírez y Myrna Laura Yeverino Gutiérrez, asesoras de mi tesis, las cuales me brindaron su total apoyo, guía, paciencia y sabiduría con gran amabilidad, en el transcurso de este trabajo. Así como a los doctores Omar González Santiago y Eder Ubaldo Arredondo Espinoza y a la doctora Ma. Del Rosario González González, por conformar mi Comité de Tesis, por su valioso apoyo en la preparación y evaluación de mis seminarios, así como su guía en el desarrollo y revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por permitirme el uso de sus instalaciones, equipos, reactivos y su invaluable ayuda en el desarrollo de esta investigación.

A mi familia, amigos y personas que contribuyen de forma directa e indirecta en la realización de este trabajo.

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tuberculosis.....	2
1.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
1.1.2 Síntomas.....	3
1.1.3 Diagnóstico.....	4
1.1.4 Epidemiología.....	4
1.2 Tratamiento estándar de primera línea.....	6
1.2.1 Isoniazida.....	7
1.2.2 Pirazinamida.....	8
1.2.3 Etambutol.....	9
1.2.4 Rifampicina.....	10
1.3 Farmacocinética de la rifampicina.....	10
1.4 Hepatotoxicidad en tratamiento estándar de primera línea.....	11
1.5 Factores de riesgo en el desarrollo de la hepatotoxicidad.....	13
1.6 Polimorfismos.....	15
1.6.1 Polimorfismos en la farmacocinética de RIF.....	15
1.7 Concentración plasmática de la rifampicina: efectividad, hepatotoxicidad.....	16
1.8 Construcción de haplotipos.....	18
1.9 Acoplamiento molecular (DOCKING).....	19
1.10 Antecedentes.....	20
1.10.1 SNP's rs4149056 y rs2306283 del gen <i>SLCO1B1</i> y desarrollo de hepatotoxicidad por fármacos.....	20
1.11 Aportaciones científicas.....	23
2. HIPÓTESIS.....	24
2.1 Hipótesis nula.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo general.....	25

3.2	Objetivos específicos .....	25
4.	METODOLOGÍA DEL TRABAJO.....	26
4.1	Metodología .....	26
4.1.1	Participantes en el estudio. ....	26
4.1.2	Cuantificación y determinación de pureza de ADN .....	27
4.1.3	Cuantificación y pureza .....	28
4.1.4	Determinación del genotipo .....	28
4.1.5	Análisis estadístico .....	29
4.1.6	Acoplamiento molecular (DOCKING).....	30
4.1.7	Disposición de residuos .....	31
5.	RESULTADOS.....	32
5.1	Variables epidemiológicas de los pacientes. ....	32
5.2	Valores de transaminasas (AST y ALT).....	37
5.3	Calidad y cantidad ADN genómico.....	38
5.4	Genotipificación de los SNP's rs4149056 y rs2306283 .....	39
5.5	Frecuencias alélicas y genotípicas.....	39
5.5.1	rs2306283.....	40
5.5.2	rs4149056.....	40
5.6	Análisis de haplotipos mediante los softwares SNPstats y SHEsis .....	41
5.7	Análisis estadístico de las variables de riesgo.....	44
5.8	Acoplamiento molecular (DOCKING).....	47
6.	DISCUSIÓN .....	50
7.	CONCLUSIÓN.....	55
	REFERENCIAS.....	57
	ANEXOS.....	68
	ANEXO 1. Material, reactivos y equipo .....	68
	Material biológico .....	68
	Materiales e instrumental utilizados en la realización del experimento. ....	68
	Equipos utilizados en la realización del experimento.....	69

## LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
TABLA I. Síntomas comunes de la tuberculosis pulmonar.....	4
TABLA II. Assay ID y secuencia sondas TaqMan .....	29
TABLA III. Valores de transaminasas.....	37
TABLA IV. Frecuencias genotípicas y alélicas de los 247 pacientes .....	41
TABLA V. Determinación de odds ratio y valor p de los haplotipos del gen <i>SLCO1B1</i> .....	43
TABLA VI. Variables epidemiológicas en el desarrollo de daño hepático .....	44
TABLA VII. Valores estadísticos de los factores de riesgo mediante regresión lineal simple .....	45
TABLA VIII. Índices de significancia, potencia estadística y tamaño del efecto .....	47
TABLA IX. Acoplamiento molecular: conformaciones y estabilidad de la unión .....	49



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Tratamientos para la tuberculosis..	7
Figura 2. Estructura química de la rifampicina..	10
Figura 3. Haplotipos conformados por los SNP's rs4149056 y rs2306283. .....	18
Figura 4. Distribución global de los haplotipos.....	21
Figura 5. Frecuencia de los haplotipos SLCO1B1*1A, *1B, *5 y *15 del gen SLCO1B1 en diferentes grupos étnicos en el mundo. ....	23
Figura 6. Distribución porcentual de la edad de los pacientes. ....	32
Figura 7. Distribución porcentual del sexo de los pacientes. ....	32
Figura 8. Distribución porcentual de las adicciones en los pacientes. ....	33
Figura 9. Distribución porcentual de la presencia de comorbilidades en los pacientes.....	34
Figura 10. Distribución porcentual de los pacientes con disminución o estabilidad del peso. ....	35
Figura 11. Distribución porcentual del tipo de infección presente en los pacientes.....	36
Figura 12. Gráfica de absorbancia de las muestras de ADN genómico de los 247 pacientes.....	38
Figura 13. Discriminación alélica para la formación de los genotipos de los SNP's .....	39
Figura 14. Conformaciones obtenidas mediante acoplamiento molecular de OATP1B1 y RIF.....	48
Figura 15. Aminoácidos que interaccionan con mayor energía de unión con RIF:.....	49

## GLOSARIO ABREVIATURAS

AADAC	Arilacetamida Desacetilasa
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATDH	Anti-tuberculosis drug-induced
BAAR	Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes
BTS	British Thoracic Society
CAR	Activador Constitutivo de la respuesta Retinoide
CES1	Carboxilesterasa 1
CES2	Carboxilesterasa 1
DILI	Drug-Induced Liver Injury
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Docking	Acoplamiento molecular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB	Etambutol
HTA	Hipertensión arterial
IMC	Índice de masa corporal
INH	Isoniazida
LGA	Algoritmo genético de Lamarckian
LSN	Límite superior normal
MMI- DILI	Metimazol-Induced Liver Injury
MTX	Metrotexato
<i>Mut</i>	Mutado
NIH	National Institutes of Health
OATP	Polipéptido transportador de aniones orgánicos
OR	Odds ratio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDB	Protein Data Bank
pLDDT	Puntuación de confianza por residuo
PXR	Receptor X de pregnano
PZA	Pirazinamida
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
R	Coefficiente de correlación
R2	Coefficiente de determinación

RIF	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
SLCO1B1	Transportador aniones orgánicos 1B1
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
TAES	Tratamiento primario Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
VDR	Receptor de la Vitamina D
<i>Wt</i>	<i>Wild type</i>

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad ocasionada por la infección con *Mycobacterium tuberculosis*. El tratamiento es un régimen de cuatro fármacos que son isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB), denominado “tratamiento estándar de primera línea” que es un tratamiento estrictamente supervisado. Existen reportes en la literatura de individuos que desarrollan hepatotoxicidad después de iniciar dicho tratamiento y es etnia dependiente. Actualmente en México no existen registros de los efectos adversos que desarrollan los pacientes con TB que están bajo el tratamiento de primera línea, sin embargo, se sugiere que factores genéticos y no genéticos influyen en su desarrollo [Li *et al.*, 2012].

La hepatotoxicidad mediada por fármacos es un evento grave que consecuentemente puede llevar a la suspensión del tratamiento y la complicación del mismo [RAPD, 2020], llegando incluso a presentar el fallecimiento de los pacientes, se estima que este efecto adverso presenta una tasa de mortalidad del 10% [Abid *et al.*, 2020].

La importancia de la variabilidad genética y sus repercusiones en la metabolización de los fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de tuberculosis, es de vital importancia para una medicación eficiente con la disminución de los efectos adversos desde trastornos gastrointestinales leves a ototoxicidad, nefrotoxicidad, neuropatías, reacciones adversas cutáneas así como daño hepático

[Prasad, Singh & Gupta., 2019], siendo este último uno de los más importantes por las limitaciones y riesgos en el tratamiento del paciente. Los polimorfismos en los genes que transportan o metabolizan RIF pueden afectar su farmacocinética y la acumulación del mismo en el organismo. La presente investigación analiza los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's), rs2306283 y rs4149056 del gen *SLCO1B1*, los cuales han sido mencionados como factores que afectan la farmacocinética de RIF y el desarrollo de daño hepático [Lee & Ho, 2017].

En Nuevo León y en México en general no existen antecedentes sobre el estudio de los polimorfismos rs2306283 y rs4149056 del gen *SLCO1B1* y su asociación con el desarrollo de hepatotoxicidad en pacientes con tratamiento estándar antituberculoso. Es por ello la trascendencia del desarrollo de la presente investigación.

### 1.1 Tuberculosis

La tuberculosis se define como una enfermedad infecciosa bacteriana y transmisible principalmente por vía respiratoria, afecta predominantemente a los pulmones, pero también puede presentarse en otros órganos, ya sea de forma activa o latente, la tuberculosis pulmonar presenta síntomas comunes como tos y flemas por más de 15 días, es una enfermedad tratable, sin embargo, puede presentarse como una enfermedad resistente a tratamiento, esto debido a la resistencia adquirida de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos de primera línea, especialmente a RIF e INH.

A principios del siglo XIX la tuberculosis era la causa de muerte de una de cada siete personas en Estados Unidos y Europa y actualmente es la principal causa de muerte por un único agente infeccioso bacteriano [PAHO, 2019; WHO, 2020]. Según datos y cifras de la OMS, tan solo en 2020, 1.5 millones de personas fallecieron por esta afección,

lo cual la posiciona como una de las diez principales causas de muerte en el mundo [WHO, 2022].

#### 1.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* pertenece al orden de los Actinomycetales. La familia Mycobacteriaceae contiene un solo género, el género *Mycobacterium*, del que en sus orígenes sólo se conocían dos especies: El bacilo de la lepra o *Mycobacterium leprae* y el bacilo tuberculoso o *Mycobacterium tuberculosis*, actualmente se han descrito más de 120 especies de micobacterias diferentes [Ryan & Ray, 2017].

En 1882 el médico y microbiólogo Robert Koch, describió y nombró al agente etiológico de la tuberculosis como “*Bacterium tuberculosis*”, para ser renombrada en 1896 como *Mycobacterium tuberculosis*, esto debido a sus características de cultivo similares a las de los hongos, de hecho esta bacteria en particular requiere técnicas especiales de tinción y medios de cultivo distintos a los empleados habitualmente en bacteriología; en sospecha de infección se requiere de la detección, aislamiento e identificación del organismo, esto comúnmente empleando la baciloscopía, la cual es una técnica de tinción poco sensible, pero económica y rápida en comparación con el cultivo del microorganismo, sin embargo, debe ir acompañado de este, ya que la baciloscopía presenta una sensibilidad del 40 al 70% de forma individual [Dorronsoro & Torraba 2007].

#### 1.1.2 Síntomas

Los síntomas o cuadro clínico que puede presentar una persona infectada dependerán del sitio de infección de la bacteria, para TBP se muestran en la TABLA I.

TABLA I

Síntomas comunes de la tuberculosis pulmonar (CDC, 2021).

Tos intensa mayor a tres semanas.	Dolor en el pecho.
Debilidad o cansancio.	Pérdida de peso.
Escalofríos.	Fiebre.
Tos con sangre o esputo.	Falta de apetito.
Sudor por las noches.	

### 1.1.3 Diagnóstico

La prueba clínica común utilizada en México para la detección y el diagnóstico de TBP son técnicas bacteriológicas, específicamente la búsqueda de Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (BAAR) en 3 muestras de expectoración seriadas [Secretaría de Salud, 2013]. Si la prueba BAAR resulta positiva esta debe ser confirmada por medio de cultivo, este mismo es el estándar de referencia en la identificación del microorganismo, siendo una prueba altamente sensible en la detección, sin embargo, requiere por lo menos de dos a tres semanas para confirmación positiva [Samper & González-Martin, 2018].

### 1.1.4 Epidemiología

De acuerdo a datos de la OMS, obtenidos en el año 2020, se estimó que 9,900,000 personas alrededor del mundo contrajeron la enfermedad, de los cuales 5.5 millones fueron hombres, 3.2 millones mujeres y 1.2 millones niños, de los cuales cerca de 1.4 millones fallecieron; como ya se mencionó, esta enfermedad es la causa número uno de muertes por un único agente infeccioso bacteriano y está entre las primeras diez causas de

muerte a nivel mundial, entre los países más afectados se encuentran India, Indonesia, China, Filipinas, el Pakistán, Nigeria, Bangladesh y Sudáfrica, representando más de dos tercios del total de casos [WHO, 2021].

#### 1.1.4.1 Epidemiología en México y Nuevo León

En México en el año 2021 se registraron 102 defunciones y 20,225 casos de tuberculosis [Secretaría de Salud, 2022], lo que representa una reducción del 36% respecto al 2020, en el cual se registraron un total de 31,724 casos, habiéndose reducido en un 35% respecto a los 48,983 casos registrados en el año 2019. La media de casos de tuberculosis en el estado de Nuevo León hasta el año 2018 fue de 1,600 casos al año, esto señalada por la Secretaría de Salud de Nuevo León, manteniéndose como uno de los diez estados con mayor incidencia de casos con una tasa promedio de letalidad del 7.5% [Cubero, 2018]. Para el año 2021 en el estado se registraron 1,181 casos, los cuales se mantiene respecto a los 1189 casos reportados en el 2020, representando en ambos años un aumento en el número de casos en años anteriores [HCNL, 2022].

#### 1.1.5 Tratamiento

Tras el análisis confirmatorio por infección de *Mycobacterium tuberculosis*, se prosigue con el tratamiento de dicha afección, el cual consiste en dosificación de medicamentos de primera línea, los cuales son los suministrados de forma general a los pacientes, estos son INH, RIF, EMB y PZA [CDC, 2021], los cuales se combinan de forma estratégica para eliminar a la bacteria; la INH actúa contra bacilos en crecimiento activo, la PZA es activa contra microorganismos intracelulares y RIF es activa contra bacilos de crecimiento lento e intermitente, la combinación de estos medicamentos presenta



actividad contra diferentes estados y actividades del *Mycobacterium tuberculosis*, este tratamiento puede durar de 6 meses a 2 años. [PAHO, 2019].

## 1.2 Tratamiento estándar de primera línea

La estrategia para el tratamiento farmacológico de los pacientes que padecen tuberculosis pulmonar se clasifica en medicamentos denominados de primera y segunda línea, siendo los primeros los que presentan una mayor eficiencia. El tratamiento de primera línea inicia con una fase intensiva de 60 dosis de los cuatro medicamentos, los cuales se suministran diariamente, posteriormente se pasa a la fase de sostén, la cual cuenta con 45 dosis de los fármacos INH y RIF, suministrando 3 dosis por semana, siendo este un tratamiento de 6 meses (ver figura 1). Estos medicamentos serán suministrados en dosis establecidas en el marco de Tratamiento primario Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) [Secretaría de Salud, 2013].



1ª línea: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E), estreptomina (S).  
2ª línea: kanamicina (Km), amikacina (Am), capreomicina (Cm), etionamida (Eth), protionamida (Pth), ofloxacina (Ofx) y levofloxacino (Lfx).

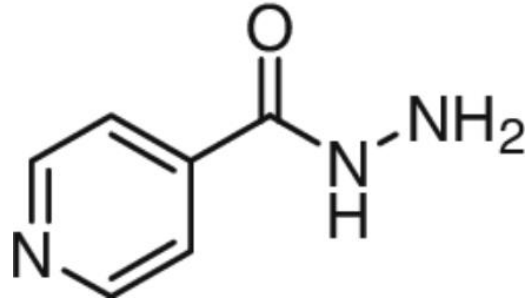
Figura 1. Tratamientos para la tuberculosis. Los tratamientos presentan una tasa de éxito elevada en los de primera línea, pero se puede observar una tasa de éxito baja al utilizar los de segunda línea y muy baja al tratar la enfermedad con un solo fármaco. Figura tomada de [CENSIDA, 2008].

Para determinar la eficiencia de dicho tratamiento es necesario el monitoreo mensual del paciente por medio de baciloscopía (observación de bacilos de Koch-Tuberculosos), para tratamientos sin éxito, es necesario realizar pruebas de resistencia a fármacos de primera línea en los pacientes afectados para tomar acciones de acuerdo con la resistencia mostrada (fármacos de segunda línea) [CENSIDA, 2008].

#### 1.2.1 Isoniazida

INH es un derivado sintético del ácido nicotínico con propiedades antimicobacterianas, es bactericida cuando las micobacterias crecen rápidamente y bacteriostática cuando crecen lentamente. La INH es un profármaco y debe ser activada por la catalasa bacteriana, específicamente, la activación se asocia con la reducción de la catalasa-peroxidasa férrica KatG micobacteriana por hidrazina y la reacción con oxígeno para formar un complejo de enzima oxiférrica.

Una vez activada, la INH inhibe la síntesis de ácidos micólicos, un componente esencial de la pared celular bacteriana. A niveles terapéuticos, la INH es bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* intracelulares y extracelulares en crecimiento activo [Beauduy & Winston, 2019].

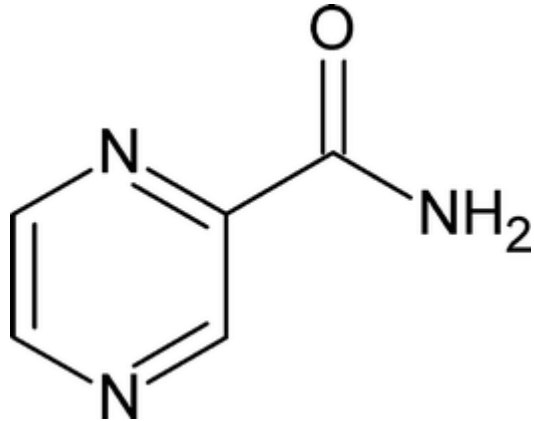


Estructura química de INH. Imagen tomada de [Andrade *et al.*, 2008].

### 1.2.2 Pirazinamida

La PZA es un derivado sintético de amida del ácido pirazinoico con propiedades bactericidas. La PZA es particularmente activa contra los bacilos intracelulares que se multiplican lentamente (no afectados por otros fármacos), se activa a ácido pirazinoico en los bacilos donde interfiere con la sintasa de ácidos grasos FAS I. Esto afecta la capacidad de las bacterias para sintetizar nuevos ácidos grasos, necesarios para el crecimiento y la replicación [Boshoff, Mizrahi & Barry, 2002; DrugBank, 2022].

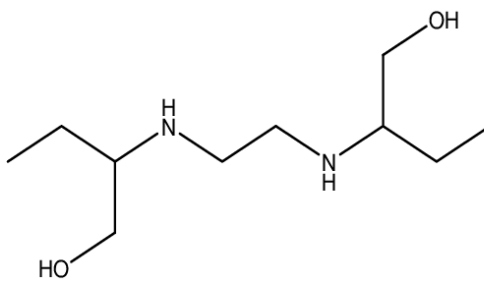
También se ha sugerido que la acumulación de ácido pirazinoico altera el potencial de membrana e interfiere con la producción de energía, necesaria para la supervivencia de *Mycobacterium tuberculosis*. También se ha demostrado que el ácido pirazinoico se une a la proteína ribosómica S1 (RpsA) e inhibe la traducción [DrugBank, 2022; Shi *et al.*, 2011].



Estructura química de PZA. Imagen tomada de [Ferraz, Leite & Malagutti., 2016].

### 1.2.3 Etambutol

Es un fármaco antimicobacteriano bacteriostático, eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis* y algunas otras micobacterias. Se utiliza en combinación con otros fármacos antituberculosos en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar y extra pulmonar. Se difunde en las células de *Mycobacterium*. Una vez dentro de la célula, el EMB inhibe las arabinosiltransferasas (embA, embB y embC), evitando la formación de los componentes de la pared celular arabinogalactano y lipoarabinomano y previniendo la división celular [DrugBank, 2022; Zhang *et al.*, 2020].



Estructura química de EMB. Imagen tomada de [Abbasi *et al.*, 2009].

### 1.2.4 Rifampicina

Un medicamento de primera línea en el tratamiento de TB es RIF, la cual pertenece a la familia de las rifamicinas, son antibióticos para el tratamiento de bacterias Gram positivas. Se caracterizan por ser una molécula macrocíclica con un grupo naftohidroquinona cromóforo, causante de la inhibición de la RNA polimerasa dependiente de DNA, específicamente con la subunidad beta de la RNA polimerasa [Manuales MSD, 2020]. RIF con fórmula molecular  $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ , peso molecular de 822,9 g / mol, un LogP de 4.9, estructura esquematizada en la figura 2. [NCBI, 2021].

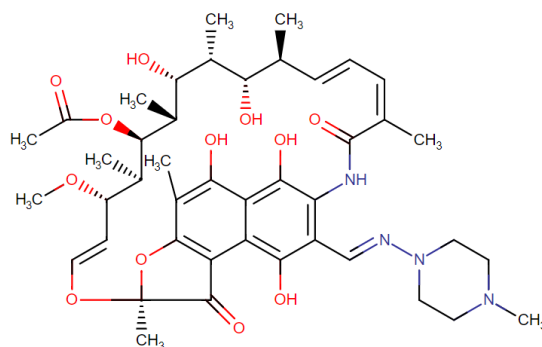


Figura 2. Estructura química de RIF. Imagen tomada de [DrugBank, 2022].

### 1.3 Farmacocinética de la rifampicina

RIF se administra junto con la INH, PZA y EMB, a una concentración de 10 mg por kilogramo de peso del paciente o 600 mg en fase intensiva y 800 mg en fase de sostén de forma generalizada [CENSIDA, 2008], pudiendo presentar reacciones adversas como daño hepático, hipersensibilidad y posibles interacciones con otros medicamentos, tales como anticonvulsivantes (fenitoína), antiarrítmicos (disopiramida, propafenona, tocainida), antipsicóticos (haloperidol), anticoagulantes orales (warfarina), antifúngicos (pfluconazol, itraconazol, ketoconazol), antirretrovirales (zidovudina, saquinavir,

indinavir) entre otros [AEMPS – CIMA, 2007], así como efectos secundarios como fatiga, somnolencia, cefalea, ligeros mareos, vértigo, anorexia, náusea, dolor abdominal, hinchazón entre otros [AEMPS – CIMA, 2022]. La RIF se administra de manera oral y se absorbe en el tracto gastrointestinal de manera fácil; las concentraciones séricas alcanzan picos de 10 µg/ml entre las 2 a 4 horas después de la administración, esta concentración disminuye con la ingesta de alimentos y cuenta con una vida media de entre 3 y 5 horas dependiendo de la concentración [AEMPS – CIMA, 2022].

Después de la absorción se elimina rápidamente en la bilis y sufre circulación enterohepática, durante este proceso experimenta desacetilación progresiva, por lo que casi todo el fármaco se encuentra en esta forma en la bilis en aproximadamente 6 horas. La reabsorción intestinal se reduce por la desacetilación y así se facilita la eliminación. Hasta 30% de una dosis se excreta en orina siendo fármaco intacto aproximadamente la mitad de ésta; RIF es distribuida ampliamente en el cuerpo, aproximadamente del 75% al 80% del fármaco se une a proteínas. La mayor parte de la fracción libre no está ionizada y por lo tanto, se difunde libremente en los tejidos. [AEMPS – CIMA, 2022]. Para la activación son necesarias las enzimas B-esterasa y arilacetamida desacetilasa, que desacetilan a RIF para que se encuentre como metabolito activo 25-desacetilrifampicina. [Thomas *et al.*, 2020].

#### 1.4 Hepatotoxicidad en tratamiento estándar de primera línea

Un problema subyacente en el tratamiento estándar contra la tuberculosis es el posible daño hepático que este mismo genera; existen evidencias de la acción directa de algunos fármacos con daño e insuficiencia hepática [Kuehn, 2009], centrándonos

específicamente en el daño producido por el tratamiento estándar antituberculoso [Mitchell *et al.*, 1995].

La detección se basa en la determinación de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) o aspartato aminotransferasa (AST), y se recomienda la interrupción del tratamiento cuando se encuentra una concentración elevada 5 veces respecto al límite superior normal (LSN), siendo estos según la British Thoracic Society (BTS) de 8 a 40 U/L en hombres y de 6 a 34 U/L en mujeres para la ALT y de 10 a 40 U/L y 7 a 35 U/L respectivamente para la AST [Tweed *et al.*, 2018].

Aunque la hepatotoxicidad es uno de los principales efectos secundarios del tratamiento de la tuberculosis, especialmente para RIF, el mecanismo de la lesión hepática inducida por este fármaco no se ha determinado claramente, sin embargo, existe evidencia de daño hepático producido por estrés oxidativo en mitocondrias, colestasis y acumulación de lípidos hepáticos [Kim *et al.*, 2017]. Adicionalmente se tiene bien documentado que RIF inhibe la captación de ácidos biliares por OATP1B1, que es un transportadores de aniones orgánicos que codifica el gen *SLCO1B1* [Li *et al.*, 2012], por lo que se propone que RIF altera la captación hepática de sales biliares y bilirrubina, compitiendo con estos compuestos por la unión con proteínas intracelulares, modificando de esta manera la excreción de bilirrubina y llevando a la aparición de un cuadro colestásico [Gómez Calzada *et al.*, 2008].

RIF es un agonista del receptor X de pregnano (PXR), este sobreexpresa y activa a la proteína PXR, la cual induce enzimas metabolizantes de fármacos, por ejemplo, CYP2B6, 2C9, 2C19 y 3A4, además PXR está relacionada con la homeostasis de sustancias endógenas, como los ácidos biliares, hormonas esteroideas de la bilirrubina, la

glucosa y los lípidos [Kim *et al.*, 2017], por lo que una acumulación del fármaco debido a una captación excesiva, aumenta la activación de dicha proteína (PXR), la cual a su vez, repercute en la activación de diversas enzimas metabolizadoras conduciendo a una posible hepatotoxicidad. A su vez, RIF actúa de forma sinérgica con la INH en el desarrollo de la hepatotoxicidad, esto debido a que como inductor de enzimas metabolizadoras induce la INH hidrolasa, la cual a partir de la INH se metaboliza a hidracina, directamente relacionada con el daño hepático inducido por INH [Tostmaan *et al.*, 2008].

### 1.5 Factores de riesgo en el desarrollo de la hepatotoxicidad

Las variables epidemiológicas son un punto a tener en cuenta en el posible desarrollo de daño hepático inducido por fármacos, esto se debe a que diversos factores como: factores demográficos, enfermedades preexistentes y sus tratamientos, el uso de sustancias dañinas o bien factores genéticos pueden predisponer al desarrollo de hepatotoxicidad [Tostmaan *et al.*, 2008].

Las variables epidemiológicas son características en los individuos de una población de estudio; los cuales incluyen la edad del paciente, su etnia, el sexo del mismo así como un índice de masa corporal bajo o desnutrición; en lo que respecta a las enfermedades preexistentes o comorbilidades se involucran enfermedades como la diabetes, hipertensión, enfermedades cardíacas, miomas, neoplasias, insuficiencia renal entre otras más; el uso de sustancias dañinas contempla el consumo habitual de alcohol, tabaco y drogas en general; respecto a los factores de riesgo genético estos incluyen variaciones en el ADN y proteínas que pueden repercutir en la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos administrados, llevando a una mala metabolización



de los mismos y desencadenando problemas como la toxicidad hepática [Golemba *et al.*, 2015; Peña, 2018].

En un estudio realizado en 2019 por Song y colaboradores en población asiática, reportaron que de 168 pacientes con tuberculosis, el 11.6% presentaron daño hepático inducido por los fármacos, en este porcentaje de pacientes con hepatotoxicidad se encontró una relación con la edad avanzada de los pacientes, alcoholismo crónico, así como un menor índice de masa corporal y una mayor puntuación en el índice de comorbilidad de Charlson, (El cual es un sistema de evaluación de la esperanza de vida a los diez años, en dependencia de la edad en que se evalúa, y de las comorbilidades del sujeto) [Song *et al.*, 2019].

En la revisión realizada por Terapegui y Peña en 2018 se encontró un aumento en las transaminasas de los pacientes mayores de 60 años en tratamiento antituberculoso de INH y RIF; además el factor étnico representó un factor de riesgo con propensión a desarrollar daño hepático en poblaciones asiáticas respecto a las demás razas; en otro estudio de Gordin y colaboradores, se determinó que pacientes de razas no caucásicas eran propensas a aumentar sus niveles de bilirrubina en tratamiento con RIF y PZA [Gordin *et al.*, 2004]. Respecto al abuso de alcohol, se encontró que el consumo superior a 40 gramos de alcohol por día incrementa 3 veces el riesgo de sufrir daño hepático por el consumo de fármacos antituberculosos. En otro estudio Lönnroth y colaboradores en el año 2008 se encontró que pacientes con consumo alto de alcohol presentan mayor riesgo de daño hepático que los pacientes que no consumían o lo hacían en dosis bajas [Lönnroth *et al.*, 2008]. Se ha documentado que existe una relación entre la interacción de los fármacos y una potenciación en el desarrollo de la hepatotoxicidad, como es el caso de la interacción

de RIF e INH, o el uso de fármacos externos al tratamiento como la interacción de INH y carbamazepina que aumentan en combinación los niveles sanguíneos de los fármacos [Terapegui & Peña, 2018].

## 1.6 Polimorfismos

### 1.6.1 Polimorfismos en la farmacocinética de RIF

Los polimorfismos se definen como la presencia de dos o más variantes de una secuencia y lugar específicos de ADN presente en diversas poblaciones, con una prevalencia mayor al 1% de la variante menos común; los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP's por sus siglas en inglés, son variaciones como su nombre lo indica de un cambio nucleótido único, estos cambios en el ADN pueden llegar a tener efecto en la transcripción y traducción del mismo [NHGRI, 2022].

Existe evidencia de como los polimorfismos en las enzimas metabolizadoras, reguladores transcripcionales y los transportadores de fármacos afectan la farmacocinética de RIF, como ejemplos de ello tenemos a enzimas metabolizadoras: La arilacetamida desacetilasa (AADAC), la carboxilesterasa 1 (CES1) y la carboxilesterasa 2 (CES2), para transportadores como el transportador de aniones orgánicos 1B1 (*SLCO1B1*) y el miembro 1 de la subfamilia B del casete de unión de ATP o Glicoproteína P (ABCB1), como también los reguladores transcripcionales, receptor X de pregnano (PXR), el activador constitutivo de la respuesta retinoide (CAR) así como reguladores de la ruta de la vitamina D y al receptor de vitamina D (VDR) [Thomas *et al.*, 2020].

El transportador *SLCO1B1* es uno de los principales transportadores de afluencia de membrana que regulan la captación hepática activa de sustratos del torrente sanguíneo al hepatocito, estudios sobre el gen *SLCO1B1* que codifica para el polipéptido

transportador de aniones orgánicos 1B1 (OATP1B1) han determinado que las variaciones en este gen influyen directamente en la farmacocinética y la farmacodinamia de los medicamentos [Robledo *et al.*, 2019], respecto al efecto de las variaciones polimórficas sobre el transportador y su efecto sobre la farmacocinética de RIF existen al menos 190 variantes genómicas, de las cuales dos están bien identificadas y caracterizadas (rs4149056 y rs2306283).

El SNP rs4149056, referido como c.521T> C, la sustitución genera un cambio de aminoácido Valina por Alanina en la posición 174 (Val174Ala). Lee *et al.*, describen que esta sustitución tiene efecto en la concentración plasmática, elevando los niveles de RIF en sangre debido a la reducción de la captación / actividad transportadora [Lee & Ho, 2017].

Por otra parte, la sustitución del SNP rs2306283 (c.388A> G) genera un cambio de aminoácido Asparagina por Ácido aspártico en posición 130 (Asn130Asp), algunos estudios asocian este cambio a un aumento significativamente con la expresión de OATP1B1 lo que sugiere un aumento de la actividad funcional de esta variante [Lee & Ho, 2017].

### 1.7 Concentración plasmática de la rifampicina: efectividad, hepatotoxicidad

Se estima que la concentración terapéutica de RIF en plasma para considerarse efectiva debe ser superior a los 8 µg/ml [Aït Moussa *et al.*, 2016], sin embargo, actualmente el tratamiento se basa en una dosificación de 10 mg/kg con una dosis máxima de 600 mg para pacientes con peso  $\geq$  60 kg, por lo que la dosis estándar es precisamente la antes mencionada [CIMA, 2020], en la cual la concentración máxima suele ser de 10

µg/ml, concentraciones por debajo o por encima de estos niveles ocasionan posibles problemas como fracaso terapéutico o toxicidad hepática.

Como se mencionó anteriormente los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen *SLCO1B1* repercuten de manera significativa en la captación hepática del fármaco, lo que a su vez afecta a la concentración plasmática de RIF, de acuerdo a estudios previos el alelo mutado del SNP rs4149056 (c.521T>C), el cual se encuentra presente en el exón 5 localizado en chr12:21178615, aumenta la concentración plasmática del fármaco, esto debido a una baja en la captación de RIF por medio del transportador OATP1B1 [Allegra *et al.*, 2017], altas concentraciones de RIF en plasma se asocian con una mayor eficiencia en el tratamiento, reduciendo el tiempo del mismo, siempre y cuando sea bien tolerado por el paciente [Abulfathi *et al.*, 2019], además de esto, altas concentraciones se asocian con la supresión de la resistencia [Gumbo *et al.*, 2007] e inclusive pueden llegar a eliminar *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a RIF [Zhang *et al.*, 2014].

Por otra parte, el alelo mutado del SNP rs2306283 (c.388A>G), el cual se encuentra presente en el exón 4 del gen, localizado en chr12:21176804, ha demostrado una captación mayor de RIF, lo cual disminuye la concentración plasmática [Dompheh *et al.*, 2018], pudiendo generar una menor concentración a la dosis terapéutica (sub-terapéutica), provocando así un fallo en la efectividad del tratamiento, a su vez la exposición a antibióticos como RIF a bajas concentraciones por tiempo prolongado puede generar micobacterias altamente resistentes [Wistrand-Yuen *et al.*, 2018]; por otra parte, la elevada captación del mismo en el hígado puede generar problemas de toxicidad por acumulación.

### 1.8 Construcción de haplotipos

Los haplotipos son una construcción o agrupación de variantes polimórficas (SNP's) que se heredan en conjunto, es decir presentan un desequilibrio de enlace, esto debido a la cercanía de las mismas, en sentido estricto son las agrupaciones posibles por las combinaciones de dichos polimorfismos [NHGRI, 2022].

Los haplotipos que conforman los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 son cuatro, esto debido a la presencia de dos variantes en cada SNP (c.521T>C y c388A>G) respectivamente, dichos haplotipos se pueden ver en la figura 3.

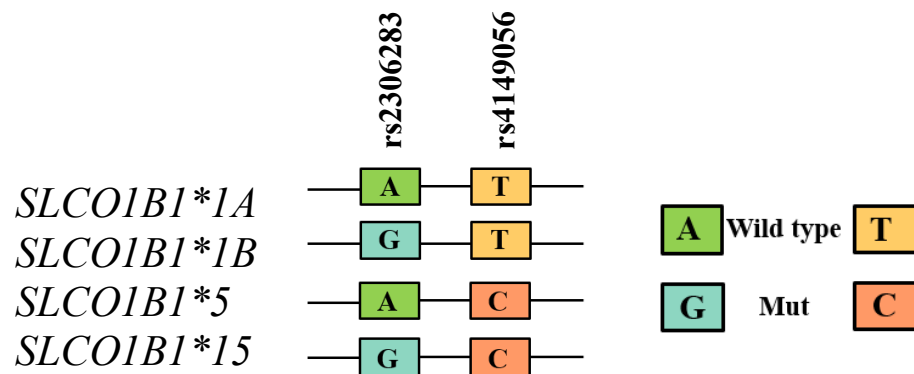


Figura 3. Haplotipos conformados por los SNP's rs4149056 y rs2306283.

Las cuatro conformaciones posibles están relacionadas con el desarrollo de hepatotoxicidad de diversos fármacos, de hecho, existe evidencia que los haplotipos *SLCO1B1\*1A* Y *SLCO1B1\*1B* están relacionados con lesiones hepáticas producidas por el fármaco metimazol [Jin *et al.*, 2019], por otra parte, los haplotipos *SLCO1B1\*5* y *SLCO1B1\*15* se relacionan con hepatotoxicidad producida por RIF en el tratamiento antituberculoso [Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2012].

### 1.9 Acoplamiento molecular (DOCKING)

El acoplamiento molecular es una técnica computacional, en la cual se predicen las energías de unión y los enlaces existentes entre una proteína y un ligando, esta técnica suele ser ampliamente usada en la industria farmacéutica en el estudio predictivo de nuevos compuestos, determinando sitios de actividad catalítica, sin embargo, este tipo de análisis puede tener otras aplicaciones como la predicción en interacciones entre proteínas, ADN-proteína, ARN-proteína, así como la evaluación de mutaciones en proteínas y su efecto en la interacción con sus ligandos; este tipo de estudios se realiza de forma predictiva y complementaria a los análisis experimentales debido a la subjetividad de dichos estudios, al tener una amplia variabilidad de programas, métodos, criterios y variables en dichos análisis [Velásquez *et al.*, 2013].

El estudio predictivo del acoplamiento resulta útil en el análisis comparativo y la determinación de las regiones que interactúan entre proteína y ligando; el estudio computacional realizado en 2021 por Tuerkova y colaboradores para la obtención de las interacciones entre los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1) y análogos de esteroides dio como resultados los residuos de aminoácidos que difieren y comparten dichos transportadores en la interacción con dichas moléculas [Tuerkova *et al.*, 2021], esta determinación es útil para identificar las mutaciones aminoacídicas que podrían repercutir en efectos en la interacción entre transportador y ligandos, lo cual conlleva al aumento o disminución de la captación de dicho sustrato.

## 1.10 Antecedentes

1.10.1 SNP's rs4149056 y rs2306283 del gen *SLCO1B1* y desarrollo de hepatotoxicidad por fármacos.

Respecto a los transportadores actualmente se reconocen como factores clave en el proceso cinético de los fármacos, el gen transportador *SLCO1B1* específicamente cumple la función de captación hepática de compuestos endógenos y xenobióticos, siendo RIF uno de estos últimos. Estudios de asociación entre polimorfismos en este gen y la farmacocinética y concentración de fármacos, así como el desarrollo de daño hepático han demostrado la importancia de este gen en la terapia.

Específicamente los polimorfismos rs4149056 (521T> C) y rs2306283 (388A> G) son variantes que se presentan con diferente frecuencia dentro de las diversas etnias donde la información sobre su disposición y el efecto sobre la respuesta a diversos fármacos, específicamente se centran en estatinas y RIF. Uno de ellos publicado por Lee & Ho en 2017 señala que las poblaciones caucásica, africana y asiática tienen frecuencias características para cada uno de los SNPs y de igual manera los haplotipos que conforman; de hecho, como se puede observar en la figura 4, existe documentación respecto a la distribución de los haplotipos generados por estos dos SNP's en gran parte del mundo, pero no en la población latinoamericana, por lo que esto presenta una gran oportunidad de estudio en dicha población.

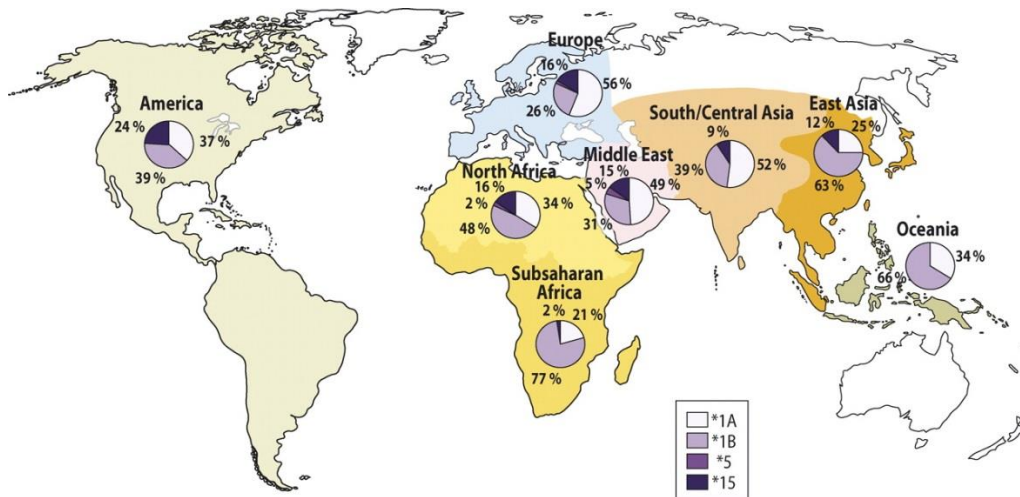


Figura 4. Distribución global de los haplotipos. - *SLCO1B1*\*A (*c.388A-c.521T*), *SLCO1B1*\*B (*c.388G-c.521T*), *SLCO1B1*\*5 (*c.388A-c.521C*) Y *SLCO1B1*\*15 (*c.388G-c.521C*) Imagen tomada de [Niemi, Pasanen & Neuvonen, 2011].

Respecto a la asociación de los haplotipos previamente señalados y su relación con el daño hepático, un estudio desarrollado en China en el 2012 por LING-MIN LI y colaboradores señaló que dentro de 24 polimorfismos reportados solo dos rs4149056 y rs2306283 son no sinónimos, lo cual quiere decir que existe un cambio aminoacídico (valina a alanina y asparagina a ácido aspártico) respectivamente en la proteína *OATP1B1*; estos SNP's se conforman a 4 haplotipos *SLCO1B1*\*1A, *SLCO1B1*\*1B, *SLCO1B1*\*5 y *SLCO1B1*\*15 de los cuales solo el haplotipo *SLCO1B1*\*15 se vió involucrado con el desarrollo de daño hepático inducido por RIF, esto en una muestra de 273 pacientes, de los cuales 118 presentaban DILI (Drug-Induced Liver Injury) [Li *et al.*, 2012].

Otro estudio de asociación desarrollado en China en el 2014 por Ru Cheng y colaboradores con 89 pacientes con ATDH (Anti-Tuberculosis Drug-induced



Hepatotoxicity) y 356 pacientes sin ATDH muestra un análisis de polimorfismos en dos transportadores de fármacos (*SLCO1B1* y *SLC10A1*). Dentro de los 6 polimorfismos de un solo nucleótido analizados se encontró que el haplotipo *SLCO1B1\*15* presentaba un mayor riesgo de padecer ATDH respecto a los haplotipos *SLCO1B1\*1A* y *SLCO1B1\*1B*, presentando un OR (Odds ratio) de 1.75, con 95% de confianza: 1.04-2.90 y  $P = 0.034$  [Chen *et al.*, 2015].

Como se ha mencionado anteriormente, este gen presenta polimorfismos implicados en el desarrollo de hepatotoxicidad específicamente los SNP's rs4149056 y rs2306283 en el haplotipo *SLCO1B1\*15*, debido a RIF en el tratamiento de la tuberculosis, sin embargo, estos polimorfismos específicos se han visto involucrados en el desarrollo de daño hepático u otros efectos adversos por diversos medicamentos, tal es el caso del metimazol, el cual está involucrado en el tratamiento del hipertiroidismo y cuyo efecto adverso principal es el DILI, de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio se determinó que los haplotipos *SLCO1B1\*1A* y *SLCO1B1\*1B* presentaban un aumento significativo respecto al grupo control con un OR = 2.21, 95% CI = 1.11-4.39,  $P = 0.023$  y (OR = 0.52, 95% CI = 0.29-0.93,  $P = 0.028$ ) respectivamente, este estudio se llevó a cabo en China con 44 pacientes con MMI-DILI y 118 pacientes sin MMI-DILI. [Jin *et al.*, 2019].

Otro ejemplo de las implicaciones de los polimorfismos en el gen *SLCO1B1* es la asociación de estos a efectos en la dinámica del metrotexato (MTX), el cual es usado como terapia en la artritis idiopática juvenil, efectos secundarios asociados a este tratamiento son padecimientos gastrointestinales y hepatotoxicidad; en un estudio realizado en el 2020 por Roszkiewicz y colaboradores asociaron el polimorfismo rs4149056 variante TT con

una mayor predisposición a desarrollar hepatotoxicidad que la variante CT / CC, con un 17,86% frente a 4,76%,  $p = 0,046$ . [Roszkiewicz *et al.*, 2021].

Es importante el estudio de la asociación entre los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 en el gen *SLCO1B1*, en la población del noreste de México, debido a la falta de información al respecto (Figura 5).

		FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS			
		Europa	África subsahariana	Asia central y sur	Asia este
<i>SLCO1B1</i> *1A	—  A  —  T  —	56%	21%	52%	25%
<i>SLCO1B1</i> *1B	—  G  —  T  —	26%	77%	39%	63%
<i>SLCO1B1</i> *5	—  A  —  C  —	2%	0%	0%	0%
<i>SLCO1B1</i> *15	—  G  —  C  —	16%	2%	9%	12%

Figura 5. Frecuencia de los haplotipos *SLCO1B1*\*1A, \*1B, \*5 y \*15 del gen *SLCO1B1* en diferentes grupos étnicos en el mundo.

### 1.11 Aportaciones científicas

El análisis de los haplotipos que conforman los polimorfismos rs4149056 y rs2306283, del gen *SLCO1B1* en pacientes con tuberculosis pulmonar tratados con terapia de primera línea, esclareció la relación entre el desarrollo de hepatotoxicidad y dichos haplotipos, esto en la población del noreste de México.

## CAPÍTULO 2

### HIPÓTESIS

Los haplotipos que conforman los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 en el gen *SLCO1B1*, están asociados significativamente al desarrollo de hepatotoxicidad en la población del noreste de México con tratamiento estándar antituberculoso.

#### 2.1 Hipótesis nula

Los haplotipos que conforman los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 en el gen *SLCO1B1*, no están asociados significativamente al desarrollo de hepatotoxicidad en la población del noreste de México con tratamiento estándar antituberculoso.

## CAPÍTULO 3

### OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Analizar y determinar la asociación entre los haplotipos *SLCO1B1\*1A*, *SLCO1B1\*1B*, *SLCO1B1\*5* y *SLCO1B1\*15* del gen *SLCO1B1* con el desarrollo de hepatotoxicidad, durante el tratamiento antituberculoso de primera línea en pacientes mexicanos del estado de Nuevo León.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Selección de la población y recolección de las muestras sanguíneas y extracción del ADN genómico.
- Evaluar el desarrollo de daño hepático por cuantificación de enzimas hepáticas: alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).
- Genotipificar los polimorfismos de un solo nucleótido rs4149056 y rs2306283, mediante discriminación alélica con sondas TaqMan (qPCR).
- Asociar los polimorfismos y haplotipos del gen *SLCO1B1* y el desarrollo de hepatotoxicidad definido por las alteraciones en suero de ALT y AST.
- Asociar las variables epidemiológicas con el desarrollo de daño hepático.
- Realizar el análisis del acoplamiento molecular (Docking) entre el fármaco (RIF) y el transportador (*SLCO1B1*).

## CAPÍTULO 4

### METODOLOGÍA DEL TRABAJO

#### 4.1 Metodología

##### 4.1.1 Participantes en el estudio.

Los participantes en el estudio son 247 pacientes del estado de Nuevo León con tuberculosis pulmonar, los cuales se encontraron en un tratamiento estandarizado de 300mg de INH, 600mg de RIF, 1,200mg de EMB y 1,500mg de PZA, por dos meses en fase intensiva; de los cuales 7 pacientes desarrollaron hepatotoxicidad.

La presencia de toxicidad hepática de los siete pacientes fue determinada por el médico asignado en consulta, mediante sintomatología característica: erupción cutánea, dolor de estómago, náuseas y vómito, fatiga, orina de color oscuro, deposiciones de color claro, ictericia, inapetencia y fiebre [HIVinfo, 2021] así como el análisis de los niveles de las transaminasas ALT y AST.

La toma de la muestra se realizó en el transcurso del tratamiento, a todos los pacientes se les explicó el propósito y valor del estudio, aquellos que estuvieron dispuestos a participar, autorizaron mediante su firma en carta de consentimiento informado, la toma de muestra y utilización de resultados en la investigación.

#### 4.1.2 Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de la muestra sanguínea mediante metodología adaptada del protocolo establecido del kit FlexiGene DNA QIAGEN:

1. Se colectan 5 ml de sangre periférica en tubos con EDTA. Centrifugar el tubo y mediante una pipeta pasteur extraer en forma cuidadosa la capa de glóbulos blancos y transferir a tubo de 1.5 ml.
2. Añadir buffer de lisis FG1 (t-octilfenoxipolietoxietanol: (4(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenol, etoxilado) hasta 1.5 ml para la disrupción de glóbulos rojos y agitar a 100 rpm por 10 minutos.
3. Centrifugar 3000 rpm/3 minutos y decantar el sobrenadante.
4. Disgregar el botón de glóbulos blancos y agitar en el agitador tipo vórtex, añadir buffer de lisis nuevamente y agitar en el vórtex.
5. Centrifugar 3000 rpm/3 minutos y decantar el sobrenadante, dejar escurrir y añadir buffer de desnaturalización y mezclar en el agitador tipo vórtex.
6. Añadir 350  $\mu$ l de buffer FG2 (clorhidrato de guanidina) y 3  $\mu$ l de proteasa, agitar suavemente y colocar en un baño de temperatura a 65°C por 30 minutos.
7. Añadir 1.5 ml de etanol 100% frío agitando suavemente para permitir la formación de las cadenas de ADN para mejor rendimiento almacenar toda la noche a -20°C y posteriormente centrifugar 10 000 rpm/10 minutos
8. Lavar el botón de ADN con 1.5 ml de etanol a 70%, mezclar en el agitador tipo vórtex y centrifugar 10 000 rpm/10 minutos.
9. Repetir el paso 9.

10. Decantar y dejar secar el tubo por dos horas, posteriormente añadir 150 µl buffer FG3 (Formulación protegida por el fabricante) para suspender el ADN.

11. El material genómico se disuelve completamente cuando el tubo es incubado a 65°C con agitación continua de 150rpm por espacio de 120 min.

#### 4.1.3 Cuantificación y pureza de ADN

La cuantificación se realiza como paso previo a la amplificación valorando cantidad y calidad del ADN, mediante espectrofotometría. Mediante el uso del espectrofotómetro NaNoDrop 2000; se preparó 1 µl del material genómico obtenido de la técnica anterior, se realizó la medición a 260 y 280 nm para la determinación de la concentración de ADN y con el resultado de la relación de las absorbancias a 260 nm /280 nm su pureza.

#### 4.1.4 Determinación del genotipo

El gen de interés fue amplificado en el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast de Applied Biosystems. El análisis de discriminación alélica consiste en utilizar dos sondas TaqMan® marcadas con diferentes fluorocromos (Vic o Fam), para cada uno de los SNP's (ver TABLA II), los cuales están silenciados por un represor o quencher. Una de las sondas reconoce al alelo normal (también llamado *wild type* o *wt*) y otro reconoce al alelo mutado (*mut*). La sonda que hibride con el ADN genómico se hidroliza por la polimerasa en los ciclos de amplificación y el fluorocromo es separado del silenciador y emite una señal que es detectada por el equipo. Las unidades de fluorescencia son equivalentes a la cantidad de producto amplificado. Dependiendo de la muestra se observaron diferentes curvas de amplificación que corresponden a los genotipos:

Homocigoto *wt*, Homocigoto *mut* y Heterocigoto. Para la determinación de los genotipos se utilizó el programa (Sequence detection Software) 1.4 (Applied Biosystems, California USA).

TABLA II

Secuencia sondas TaqMan.

	<b>rs4149056</b>	<b>rs2306283</b>
Assay ID*	C__30633906_10	C__1901697_20
Secuencia (VIC/FAM)	TCTGGGTCATACATGTGGA TATATG[C/T]GTTTCATGGGT AATATGCTTCGTGGA	CAGGTATTCTAAAGAACTA ATATC[A/G]ATTCATCAGAAA ATTCAACATCGAC

Nota: \*Assay ID = identificación del ensayo.

El mix de reactivos para la PCR cuantitativa absoluta se obtuvo de ThermoFisherScientific (Loughborough, Reino Unido). Las condiciones de PCR para los SNP's consistieron en: un paso de desnaturalización inicial a 95 ° C durante 15 min, seguido de 40 a 50 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 15 segundos y luego una extensión a 60 ° C durante 60 segundos, con una lectura de placa después de cada ciclo. Cada mezcla de PCR contenía 1 µl de ADN genómico, 12,5 µl de mezcla de PCR cuantitativa absoluta (2 ×), 1,25 µl de mezcla de cebadores (20 ×) y 1,25 µl de mezcla de sondas (20 ×), hasta 25 µl con agua. Todos los ensayos de genotipificación se realizaron por duplicado y se asignó un genotipo solo cuando los dos ensayos separados coincidieran.

#### 4.1.5 Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípica de cada uno de los polimorfismos, incluyendo la construcción de haplotipos y el desequilibrio de enlace, se realizó mediante los



programas: SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) y SHEsis (<http://shesisplus.bio-x.cn/SHEsis.html>). El cálculo del equilibrio de Hardy-Wienberg se realizó mediante la prueba de  $X^2$  y exacta de Fisher. Las diferencias entre ambas poblaciones se considerarán estadísticamente significativas cuando la  $p < 0.05$ . El riesgo de presentar hepatotoxicidad asociado a los SNP's y sus haplotipos fue evaluado mediante OR.

Las variables epidemiológicas (edad, sexo, tipo de infección, comorbilidades, disminución de peso, adicciones e ÍMC) de los pacientes se analizó mediante regresión lineal simple y múltiple mediante el programa IBM SPSS Statistics 27.0. La asociación entre las variables epidemiológicas y la presencia de hepatotoxicidad se consideró estadísticamente significativas cuando la  $p < 0.05$ .

#### 4.1.6 Acoplamiento molecular (DOCKING)

Para el acoplamiento molecular se obtuvo el modelo computarizado del transportador debido a la inexistencia de la cristalización de la proteína, dicho modelo fue obtenido de la base de datos RCSB Protein Data Bank (PDB) [[rcsb.org/structure/AF\\_AFQ9Y6L6F1](https://rcsb.org/structure/AF_AFQ9Y6L6F1)], este mismo presenta una puntuación de confianza por residuo (pLDDT) global de 80.81% lo cual lo hace un modelo apto para trabajar. El cambio de los aminoácidos (Asn130Asp y Val174Ala) se llevó a cabo mediante la herramienta bioinformática PyMOL (<https://pymol.org/2/>) obteniendo así la proteína transportadora mutada en dichos residuos.

En la obtención de la estructura tridimensional de RIF se requirió descargar la estructura bidimensional del fármaco, esta misma fue obtenida de la base de datos PubChem [NCBI, 2022], una vez descargado el archivo SDF de la base, se utilizó el

visualizador y editor molecular Avogadro (<https://avogadro.cc/>) para determinar la estructura tridimensional mediante la minimización de energía en la estructura atómica.

Una vez obtenidas la estructura computarizada del transportador OATP1B1, así como su estructura modificada (cambio de residuos) y la estructura tridimensional del fármaco RIF, se realizó el Docking mediante el software AutoDockTools en el cual cargamos dichas estructuras, se agregaron las cargas de Kollman para el transportador, así como las cargas parciales de Gasteiger para el fármaco. Se realizó un Docking ciego (Buscando el sitio de afinidad mayor en todo el transportador) debido a la inexistencia de datos respecto a los sitios de interacción de OATP1B1 y RIF, para configurar el acoplamiento, se utilizó el algoritmo genético de Lamarckian (LGA), para los algoritmos genéticos, los parámetros se configuraron como 150, 0,02, 0,8, 27000 y 2500000 para el tamaño de la población, la tasa de mutación, la tasa de cruce, el número máximo de generación y el número máximo de evaluaciones de energía, respectivamente [Kaboli, Ismail & Ling, 2018].

#### 4.1.7 Disposición de residuos

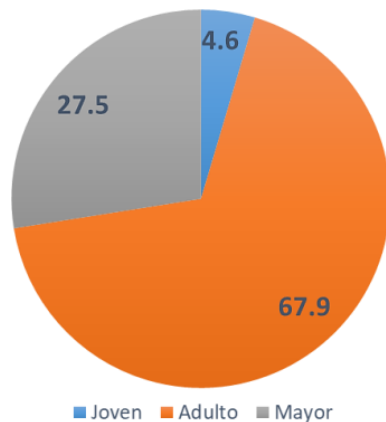
Para la disposición de residuos químicos y biológicos nos apoyamos en los procedimientos establecidos en el laboratorio de Inmunogenética del Centro De Investigación Biomédica Del Noreste IMSS, basados en el manual de procedimientos para el manejo y control de residuos biológico-infecciosos y tóxico-peligrosos del Instituto Mexicano del Seguro Social, el cual a su vez se rige por la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental, así como a su reglamentos y normas oficiales mexicanas que lo componen.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Variables epidemiológicas de los pacientes.

##### A. Distribución porcentual de la edad de los pacientes TBP.



##### B. Distribución porcentual de la edad de los pacientes con hepatotoxicidad.

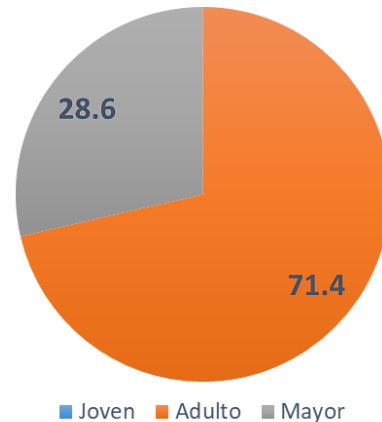
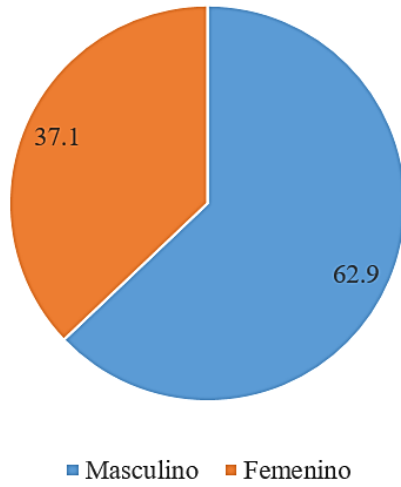


Figura 6. Distribución porcentual de la edad de los pacientes. Los pacientes se distribuyeron en Jóvenes (<18 años), Adultos ( $\geq 18$  años y < 60 Años) y Adultos mayores ( $\geq 60$  años). En la gráfica A de la figura 6, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y sin hepatotoxicidad, representando así los jóvenes el 4.6% (N=11), adultos 67.9% (N=163) y adultos mayores 27.5% (N=66). En la gráfica B de la figura 6, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y con hepatotoxicidad, representando así los jóvenes el 0%, adultos 71.4% (N=5) y adultos mayores 28.6% (N=2).

**A. Distribución porcentual del sexo de los pacientes TBP.**



**B. Distribución porcentual del sexo de los pacientes con hepatotoxicidad.**

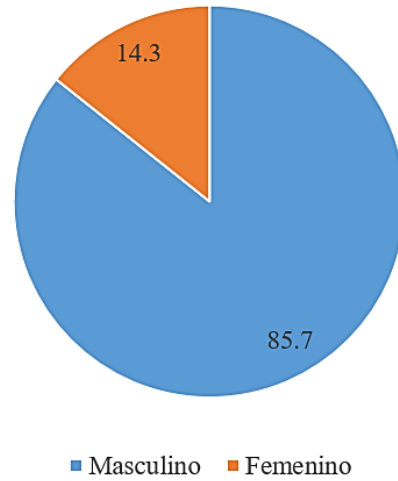
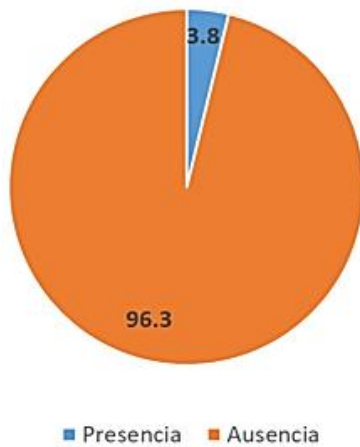


Figura 7. Distribución porcentual del sexo de los pacientes. Los pacientes se distribuyeron en pacientes de sexo masculino y femenino. En la gráfica A de la figura 7, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y sin hepatotoxicidad, representando así los pacientes del sexo masculino el 62.9% (N=151) y los pacientes del sexo Femenino 37.1% (N=89) del total. En la gráfica B de la figura 7, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y con hepatotoxicidad, representando así los pacientes del sexo masculino el 85.7% (N=6) y el sexo femenino 14.3% (N=1) del total.

**A. Distribución porcentual adicciones de los pacientes TBP.**



**B. Distribución porcentual adicciones de los pacientes con hepatotoxicidad.**

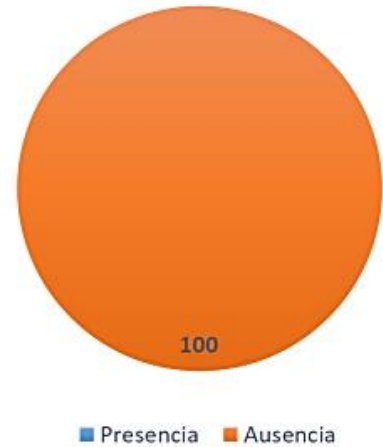
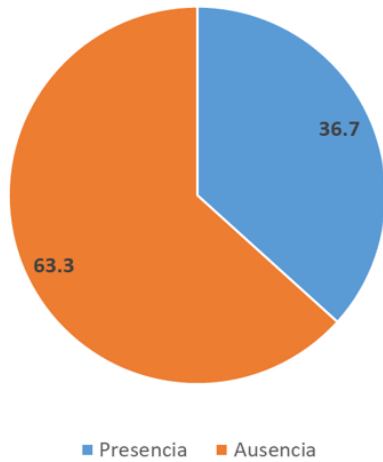


Figura 8. Distribución porcentual de las adicciones en los pacientes. Los pacientes se distribuyeron en pacientes con ausencia o presencia de adicciones (Alcohol, tabaco y consumo de drogas). En la gráfica A de la figura 8, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y sin hepatotoxicidad, representando así los pacientes sin presencia de adicciones el 96.3% (N=231), presentando solo 3.8% (N=9) adicciones. En la gráfica B de la figura 8, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y con hepatotoxicidad, teniendo así el 100% (N=7) ausencia de adicciones.

**A. Distribución porcentual comorbilidades en los pacientes TBP.**



**B. Distribución porcentual comorbilidades en los pacientes con hepatotoxicidad.**

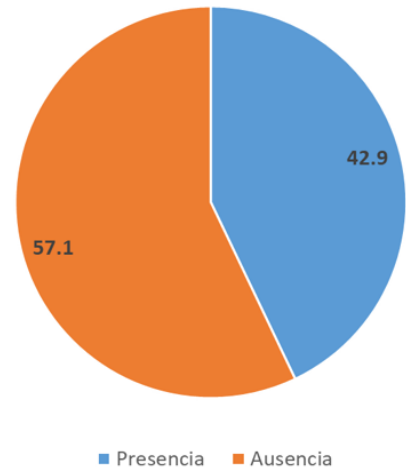
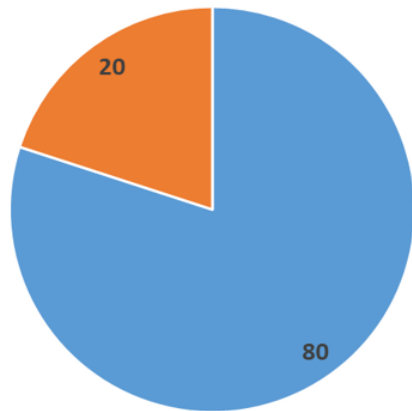


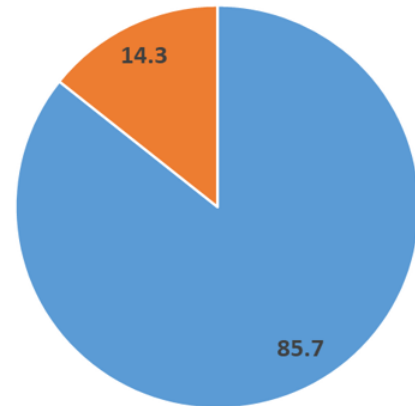
Figura 9. Distribución porcentual de la presencia de comorbilidades en los pacientes. Los pacientes se distribuyeron en pacientes con presencia o ausencia de comorbilidades (diabetes, HTA, cardiopatías). En la gráfica A de la figura 9, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y sin hepatotoxicidad, representando así los pacientes con ausencia de comorbilidades el 63.3% (N=152) y los pacientes con presencia de las mismas el 36.7% (N=88) del total. En la gráfica B de la figura 9, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y con hepatotoxicidad, representando así los pacientes con ausencia de comorbilidades el 57.1% (N=4) y los pacientes con presencia el 42.9% (N=3) del total.

**A. Distribución porcentual disminución del peso en los pacientes TBP.**



■ Disminución ■ Estable

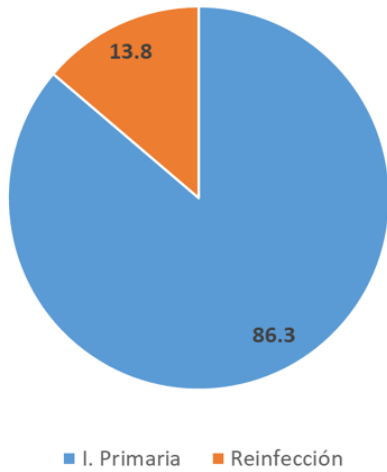
**B. Distribución porcentual disminución del peso en los pacientes con hepatotoxicidad.**



■ Disminución ■ Estable

Figura 10. Distribución porcentual de los pacientes con disminución o estabilidad del peso. Los pacientes se distribuyeron en pacientes con y sin disminución del peso durante el tratamiento. En la gráfica A de la figura 10, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y sin hepatotoxicidad, representando así los pacientes con disminución de su peso corporal el 80% (N=192) y los pacientes con ausencia de cambios en el mismo el 20% (N=48) del total. En la gráfica B de la figura 10, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y con hepatotoxicidad, representando así los pacientes con disminución de su peso corporal el 85.7% (N=6) y los pacientes con ausencia de cambios en el peso el 14.3% (N=1) del total.

**A. Distribución porcentual tipo de infección en los pacientes TBP.**



**B. Distribución porcentual tipo de infección en los pacientes con hepatotoxicidad.**

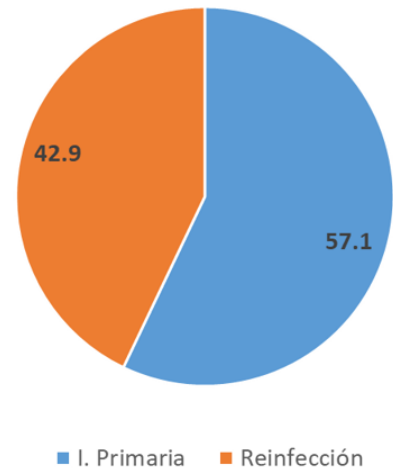


Figura 11. Distribución porcentual del tipo de infección presente en los pacientes. Los pacientes se distribuyeron en pacientes con infección primaria o reinfección en el tratamiento. En la gráfica A de la figura 11, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y sin hepatotoxicidad, representando así los pacientes con infección primaria el 86.3% (N=207) y los pacientes que presentaron una reinfección fueron el 13.8% (N=33) del total. En la gráfica B de la figura 11, se observan los porcentajes de los pacientes con tuberculosis y con hepatotoxicidad, representando así los pacientes con infección primaria el 57.1% (N=4) y los pacientes con reinfección el 42.9% (N=3) del total.



## 5.2 Valores de transaminasas (AST y ALT)

TABLA III

Concentración de transaminasas en pacientes con valores superiores al doble del LSN.

<b>Paciente ID</b>	<b>Sexo</b>	<b>Valores AST</b>	<b>Valores ALT</b>
1524	Femenino	101 U/L	87 U/L
1344	Masculino	103 U/L	76 U/L
1007	Masculino	122 U/L	97 U/L
1377	Masculino	116 U/L	123 U/L
1437	Masculino	134 U/L	112 U/L
1509	Masculino	124 U/L	102 U/L
1596	Masculino	75 U/L	89U/L

LSN: Limite Superior Normal

Rango de las concentraciones normales de las transaminasas AST y ALT [Tweed *et al.*, 2018]:

- Aspartato transaminasa (AST) en concentración de 8 a 40 U/L en hombres y de 6 a 34 U/L en mujeres.
- Alanina transaminasa (ALT) en concentración de 10 a 40 U/L en hombres y 7 a 35 U/L en mujeres.

### 5.3 Calidad y cantidad ADN genómico

Se obtuvieron las curvas de absorbancia de las muestras, como se ejemplifica en la figura 12, obtenidas mediante espectrofotómetro NaNoDrop 2000, arrojando resultados de la calidad y cantidad de ADN genómico presente en nuestras muestras.

Todas las muestras presentaban una pureza entre óptima y aceptable a una relación de absorbancias en el rango de 1.8-2.0 para 260/280 nm y de 1.8-2.2 de rango para 230/260 nm, indicando la ausencia de contaminantes como fenoles, proteínas, carbohidratos y ARN.

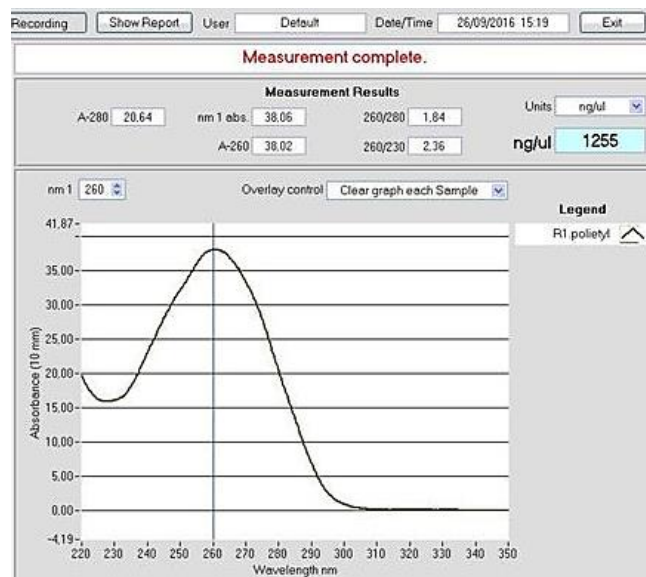


Figura 12. Gráfica de absorbancia. Ejemplo de absorbancia de una muestra de ADN analizada.

#### 5.4 Genotipificación de los SNP's rs4149056 y rs2306283

Mediante la discriminación alélica por sondas TaqMan y el sistema de PCR en tiempo real se obtuvieron los genotipos de cada una de las 247 muestras, esta discriminación alélica se obtuvo mediante los fluorocromos Vic y Fam, los cuales fueron detectados por el software Sequence detection Software 1.4 de Applied Biosystems (Figura 13).

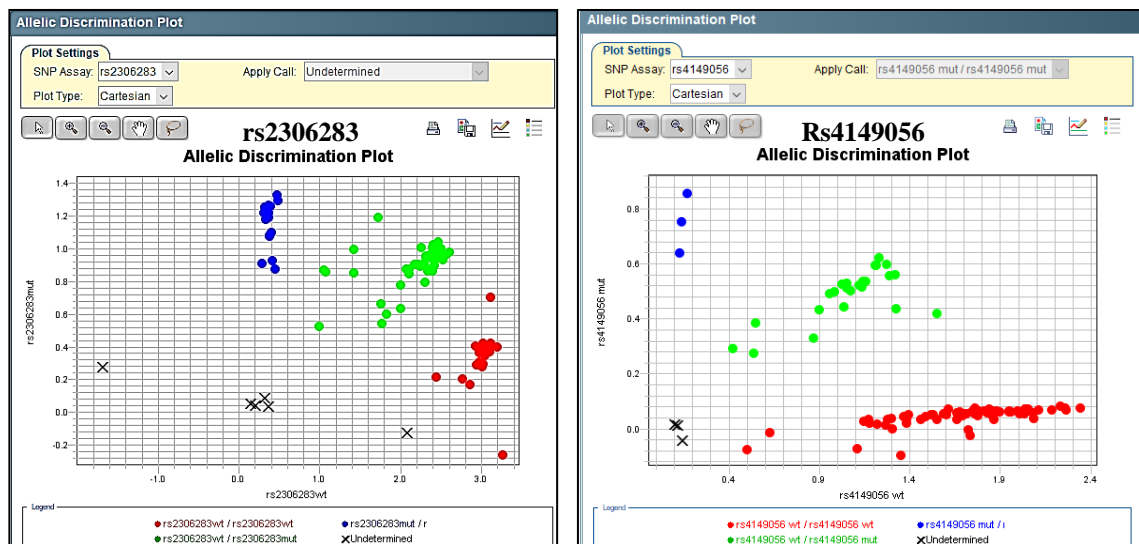


Figura 13. Discriminación alélica para la formación de los genotipos de los SNP's (rs2306283 y rs4149056). Software Sequence detection 1.4 de Applied Biosystems. Determinación de los genotipos homocigoto *wild type* (*wt/wt*) en color rojo, heterocigoto (*wt/mut*) en color verde y homocigoto mutado (*mut/mut*) en color azul.

#### 5.5 Frecuencias alélicas y genotípicas

Mediante los programas bioinformáticos SNPstats Y SHEsis se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas. Los resultados mostraron que para ambos SNP's las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (TABLA IV).

### 5.5.1 rs2306283

En lo que respecta a la distribución alélica del SNP rs2306283, los alelos A (*wt*) y G (*mut*) se encuentran en una distribución similar de 48% y 52% respectivamente para los pacientes sin hepatotoxicidad; por otro lado, los pacientes con daño hepático muestran una tendencia clara por presentar al menos un alelo de tipo G, siendo este el 64% del total, si bien en la TABLA IV se puede observar un OR de 0.614 [0.202-1.859] para el alelo A, indicando al mismo como alelo protector, un valor p de 0.383 descarta esta asociación como significativa. Los genotipos conformados por los alelos del SNP nos muestran que el genotipo heterocigoto AG y el genotipo homocigoto mutado GG representan el 86% de los pacientes con hepatotoxicidad; por su parte, los pacientes que no presentaron hepatotoxicidad durante el tratamiento muestran una tendencia por el genotipo heterocigoto 48%, 23% para homocigoto *wild type* AA y 29% para el homocigoto mutado (TABLA IV); ningún genotipo del SNP muestra asociaciones estadísticamente significativas con el desarrollo de hepatotoxicidad.

### 5.5.2 rs4149056

Las frecuencias alélicas para rs4149056 en los pacientes con TBP no hepatotóxicos fueron: alelo T (*wt*) de 90% y para el alelo C(*mut*) el 10%. En el caso de pacientes con TBP con hepatotoxicidad, el alelo T (*wt*), se presentó en el 100% de los pacientes (TABLA IV). Los genotipos conformados por los alelos del SNP nos muestran que el genotipo homocigoto *wild type* TT representa el 100% de los pacientes con hepatotoxicidad, por su parte, los pacientes que no presentaron hepatotoxicidad durante el tratamiento muestran una tendencia por el genotipo homocigoto *wild type* del 80%. Se obtuvieron solo 2 pacientes con el genotipo homocigoto mutado (1%) y 19% de los pacientes fueron

heterocigotos; como se puede observar en la TABLA IV, no existen asociaciones estadísticamente significativas entre los alelos o los genotipos que conforman y el desarrollo de hepatotoxicidad.

TABLA IV

Frecuencias genotípicas y alélicas en las poblaciones estudiadas.

<i>SNP</i>	<i>Genotipo/Alelos</i>	TBP N=240	TBP/Hepatotoxicos N=7	<i>Valores P</i>
		N(%)	N(%)	
rs2306283	A/A	56 (23)	1 (14)	0.676
	A/G	116 (48)	3 (43)	
	G/G	68 (29)	3 (43)	
	A	228 (48)	5 (36)	0.383
	G	252 (52)	9 (64)	
rs4149056	T/T	192 (80)	7 (100)	0.419
	T/C	46 (19)	0	
	C/C	2 (1)	0	
	T	430 (90)	14 (100)	0.202
	C	50 (10)	0	

N= Número de pacientes.

### 5.6 Análisis de haplotipos mediante los softwares SNPstats y SHEsis

Se emplearon las herramientas bioinformáticas SNPstats y SHEsis para la determinación de los haplotipos conformados por los SNP's rs4149056 y rs2306283, se utilizó la herramienta SNPstats para la obtención de los resultados y se validaron mediante el programa SHEsis el cual además aportó los valores del desequilibrio de enlace y el coeficiente de determinación. El análisis de los resultados se muestra en la Tabla V, con las frecuencias de los 4 haplotipos conformados, donde los haplotipos *SLCO1B1*\*5 y *SLCO1B1*\*15, no están presentes en los pacientes con TBP y hepatotoxicidad, y su

frecuencia es baja en los pacientes con TBP (0.009 y 0.096 respectivamente). Al compararse las frecuencias de los haplotipos *SLCO1B1*\*1A y *SLCO1B1*\*1B, observamos que no hay diferencias significativas, pero en el caso del haplotipo *SLCO1B1*\*1B, el OR es de 2,35 debido a la diferencia entre las frecuencias para ambas poblaciones (0.357 y 0.643 respectivamente) pero con una  $p=0.119$  (No significativa).

Respecto al haplotipo *SLCO1B1*\*1B se muestra un aumento en la frecuencia del 49% en los pacientes con TBP y hepatotoxicidad, comparado con los pacientes solo con TBP; respecto a los haplotipos *SLCO1B1*\*5 y *SLCO1B1*\*15 solo se presentaron pacientes con TBP y sin hepatotoxicidad con frecuencias de 0.009 y 0.096 respectivamente.

El análisis global de los haplotipos nos mostró una  $p$  no significativa, por lo cual se acepta la hipótesis nula, y los haplotipos del gen *SLCO1B1* \*1A, \*1B, \*5, \*15 no son factores de riesgo para la asociación de hepatotoxicidad por RIF en pacientes con TBP.

TABLA V

Determinación de Odds ratio y valor p de los haplotipos del gen *SLCO1B1*.

<b>Haplotipo</b>	<b>Alelo</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frec.</b>	<b>Frec.</b>	<b>Valor p</b>	<b>Odds ratio</b>
			<b>TBP</b>	<b>HPTX</b>		<b>[95% IC]</b>
<i>SLCO1B1*1A</i>	A	T	0.466	0.357	0.403	0.625 [0.207-1.894]
<i>SLCO1B1*1B</i>	G	T	0.429	0.643	0.119	2.354 [0.777-7.130]
<i>SLCO1B1*5</i>	A	C	0.009	-	-	-
<i>SLCO1B1*15</i>	G	C	0.096	-	0.223	-
Desequilibrio de enlace:						0.819
Coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> ):						0.067

HPTX: Pacientes con hepatotoxicidad y TBP, IC: Intervalo de confianza.

El desequilibrio de enlace es la asociación no aleatoria de alelos de diferentes loci, donde la frecuencia de asociación de los diferentes alelos es mayor o menor de lo esperado. En el caso específico de nuestras poblaciones el haplotipo *SLCO1B1\*1B*, tiene un desequilibrio de enlace de 0.819, lo que señala que los alelos que conforman dichos haplotipos se transmiten conjuntamente.

El coeficiente de determinación es la proporción de la varianza total de la variable explicada por la regresión, obteniendo valores entre cero y uno; en este estudio la R<sup>2</sup> nos dio un resultado de 0.067, lo cual señala que la variabilidad en los haplotipos no explica la variabilidad en el desarrollo de hepatotoxicidad.

### 5.7 Análisis estadístico de las variables de riesgo

Las variables independientes es decir factores de riesgo los cuales se enlistan en la TABLA VI se analizaron para determinar su relación y efecto con la variable dependiente es decir el desarrollo de hepatotoxicidad en los pacientes; se analizaron los métodos de regresión lineal simple (cada factor de forma independiente), regresión lineal múltiple y por regresión lineal múltiple por pasos.

TABLA VI

Variables epidemiológicas en el desarrollo de daño hepático.

VARIABLES	CLASIFICACIÓN		
EDAD	Joven (<18 años)	Adulto (≥18 y < 60 años)	Adulto mayor (≥60 años)
SEXO	Femenino	Masculino	
TIPO DE INFECCIÓN	Primaria	Reinfección	
COMORBILIDAD	Presencia	Ausencia	
DISMINUCIÓN DE PESO	Presencia	Ausencia	
ADICCIONES	Alcoholismo	Tabaquismo	Drogadicción
ÍMC	Bajo	Medio	Alto

Se realizó un análisis de regresión lineal simple para cada uno de los factores de riesgo (ver TABLA VII) en los cuales se obtuvieron los valores del coeficiente de correlación de Pearson (r), Coeficiente de determinación ( $R^2$ ), valor F y su significancia.



TABLA VII

Valores estadísticos de los factores de riesgo mediante regresión lineal simple.

FACTOR DE RIESGO	r	R <sup>2</sup>	F	Sig.
EDAD	0.018	0.001	0.081	0.776
SEXO	0.023	0.001	0.127	0.772
TIPO DE INFECCIÓN	0.137	0.019	4.678	<b>0.032</b>
COMORBILIDAD	0.021	0.001	0.111	0.739
DISMINUCIÓN DE PESO	0.024	0.001	0.139	0.710
ADICCIONES	0.033	0.001	0.271	0.603
ÍMC	0.025	0.001	0.157	0.692

r: Coeficiente de correlación de Pearson, R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación, F: Valor F, Sig.: Significancia estadística.

Se pueden observar en la TABLA VII el análisis de regresión lineal simple de los factores de riesgo, los factores edad, sexo, comorbilidades, disminución de peso, adicciones y el IMC obtuvieron valores no significativos, presentando valores en el coeficiente de determinación de 0.001 en cada modelo, lo que nos indica que el desarrollo de hepatotoxicidad en el tratamiento estándar de primera línea antituberculoso no es explicado por los factores de riesgo previamente señalados, esto aunado a una significancia considerablemente mayor a 0.05 en cada uno de los modelos, lo que invalida a estos factores como candidatos a ser la causa del desarrollo del daño hepático. Por otra parte, el tipo de infección (si presentó tuberculosis por primera vez o es reincidente el paciente en el tratamiento) nos muestra una significancia menor a 0.05 lo cual valida el resultado de forma positiva, sin embargo, presenta una R<sup>2</sup> de 0.019, que si bien es mayor

a los coeficientes de determinación obtenidos por los otros factores de riesgo, nos indica que solo el 1.9% de la presencia de hepatotoxicidad por el tratamiento es explicada por el tipo de infección que presenta (infección primaria/reinfección) en base al grupo de pacientes, lo cual podría ser considerado por los clínicos para aquellos pacientes que tienen una reinfección con monitoreo serial de enzimas hepáticas.

Tras el análisis de los factores de forma independiente se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, en el que se introdujeron todas las variables, sin embargo, se obtuvo una significancia de 0.565 y una  $R^2$  de 0.024, lo cual nos indica que la incorporación de todos los factores de riesgo no influye ni explica el desarrollo de hepatotoxicidad en los pacientes.

El modelo de regresión lineal múltiple muestra que los factores de riesgo no están involucrados con el daño hepático a excepción del tipo de infección primaria o secundaria, con una  $p=0.032$ ,  $R^2=0.19$ ,  $F=4.6$ , similar al análisis a la regresión lineal simple debido a la eliminación de las otras variables de riesgo.

Además de los datos obtenidos en la regresión lineal se calcularon la potencia estadística y el tamaño del efecto de dicho modelo (ver TABLA VIII) obteniendo un potencial estadístico de 0.999 superior al índice de 0.80 y un tamaño de efecto bajo de 0.019 (menores a 0.200); y por último el indicador de Drubin Watson que se ubicó dentro de las dos unidades, lo que permite una generalización de los datos.

TABLA VIII

Índices de significancia, potencia estadística y tamaño del efecto.

Modelo	F	R <sup>2</sup>	ΔR <sup>2</sup>	B	ERROR ESTÁNDAR	β	P	1-β	F <sup>2</sup>
TIPO DE INFECCIÓN	4.678 (1-245)	0.019	0.015	0.064	0.030	0.137	0.032	0.999	0.019

F: Valor F (razón de varianza), R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación., ΔR<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación ajustado, B: Coeficiente de regresión B, β: Coeficiente de regresión, p: Valor p (significancia estadística), 1-B: Potencial estadístico. F<sup>2</sup>: Tamaño de efecto.

### 5.8 Acoplamiento molecular (DOCKING)

El análisis de acoplamiento entre el transportador de aniones orgánicos OATP1B1 y el fármaco antimicrobacteriano RIF realizado mediante el software AutoDockTools, se realizó tanto para la proteína transportadora *wild type* (sin mutaciones) y su contraparte, la proteína mutada en ambos aminoácidos representada en la figura 14 (A y B respectivamente); la búsqueda de las interacciones de mayor afinidad se realizó en toda la estructura proteica del transportador, realizando así un “Docking ciego” (C). Para la realización del análisis se incorporaron los hidrógenos polares y las cargas parciales de Kollman, en las cuales se obtuvo un total de 25, esto en OATP1B1; por su parte, para RIF se adicionaron todos los hidrógenos y las cargas de Gasteiger con un total de 1.0001; RIF muestra un total de 5 enlaces rotables, 52 hidrógenos no polares, así como 10 carbonos aromáticos.

Se obtuvieron las 10 mejores conformaciones en cada análisis, obteniendo resultados de la energía de unión, eficiencia de ligado y la constante de inhibición para cada uno de ellos; en la figura 14 (D, E y F) se muestran las 3 mejores conformaciones obtenidas, los valores de cada conformación se muestran en la TABLA IX, dichos valores

permanecieron idénticos entre el Docking realizado con la proteína con y sin las mutaciones.

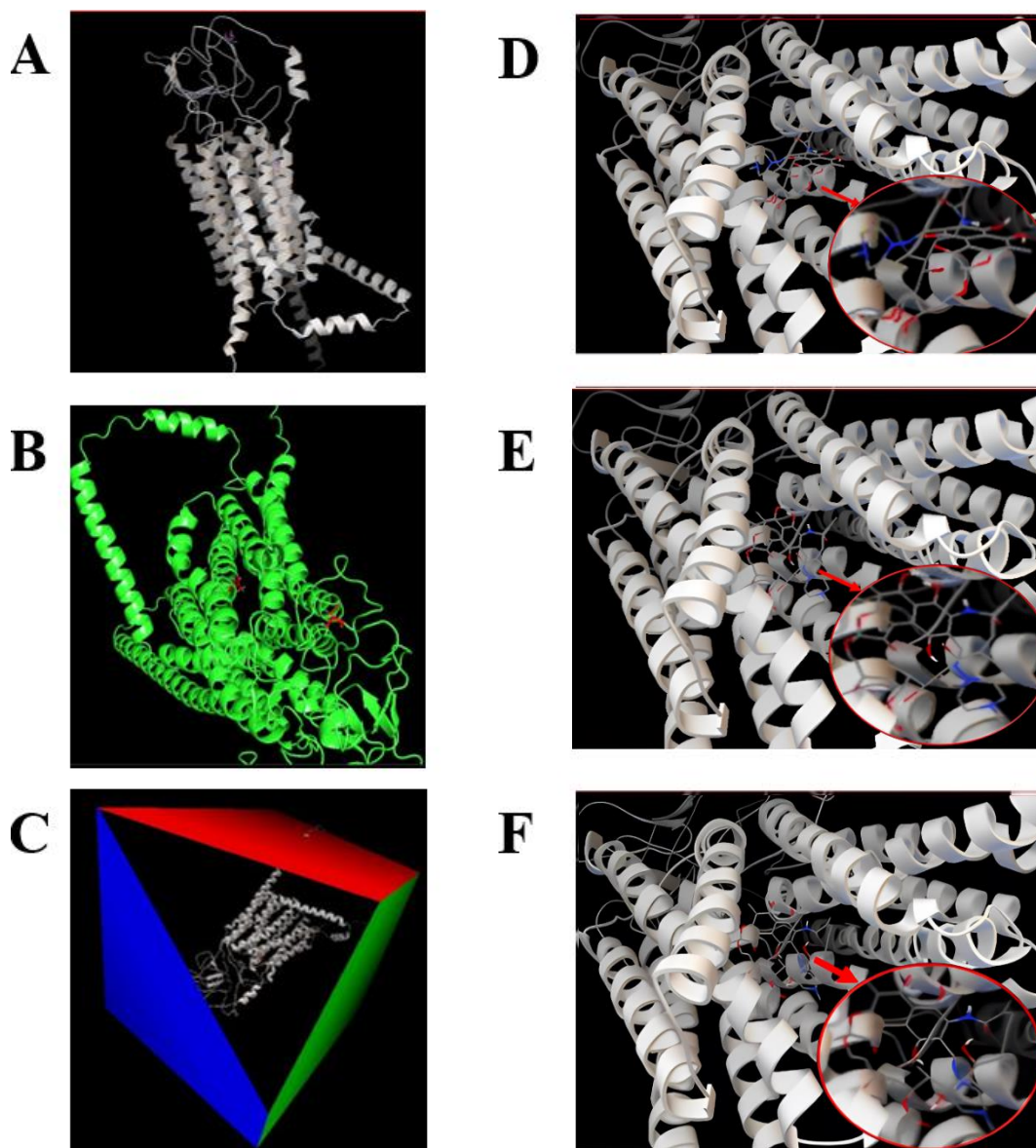


Figura 14. Conformaciones obtenidas mediante acoplamiento molecular de OATP1B1 y RIF. (A) Estructura computarizada de la proteína transportadora. (B) Proteína transportadora mutada en los residuos Asn130Asp y Val174Ala. (C) Docking ciego realizado en la totalidad del transportador. (D) Conformación I del acoplamiento, (E) Conformación II del acoplamiento y (F) Conformación III del acoplamiento.

TABLA IX

Acoplamiento molecular: Conformaciones y estabilidad de la unión.

Conformaciones	Energía de unión (kcal/mol)	Eficiencia de ligando (kcal/mol)	Constante de inhibición (mM)
<b>D</b>	-4.47	-0.08	525.51
<b>E</b>	-4.94	-0.08	240.9
<b>F</b>	-5.52	-0.09	90.62

Una vez realizado el análisis de las interacciones entre el transportador y RIF se obtuvieron los residuos de aminoácidos predominantes en las interacciones con mayor energía de unión como se muestra en la figura 15.

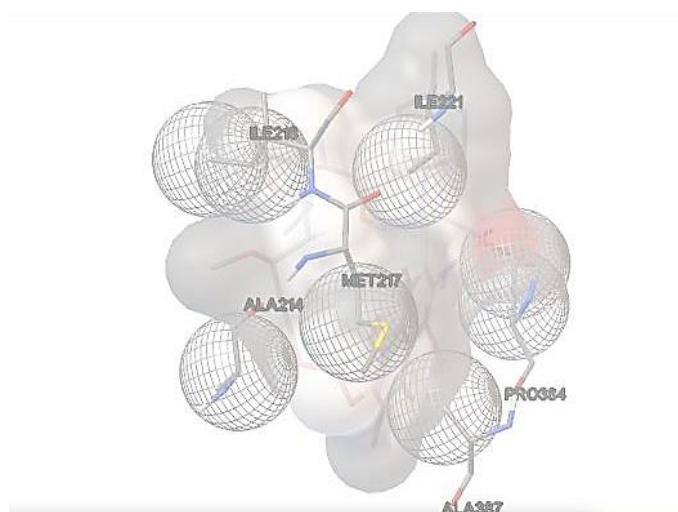


Figura 15. Aminoácidos que interactúan con mayor energía de unión con RIF: ALA214, MET217, ILE218, ILE221, ALA387 y PRO384.

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN

Mediante la discriminación alélica por sondas TaqMan se obtuvieron las frecuencias alélicas del SNP rs4149056, donde la frecuencia del alelo T (wt) y C (mut) para los pacientes con TBP y los pacientes con TBP con hepatotoxicidad fue similar (0.9 y 0.1 respectivamente); estas frecuencias se presentaron de manera similar a las obtenidas por el proyecto ALFA (T=0.877 y C=0.123) [Phan et al., 2020] en la población sud americana (Individuos latinoamericanos con ascendencia mayoritariamente europea y nativa americana) y a las frecuencias obtenidas en la población americana en el proyecto 1000 GENOMAS (T=0.866 y C=0.134) y en los datos obtenidos en la población española ((T=0.873 y C=0.127) [1000 Genomes Project Consortium, 2015].

Por otra parte, las frecuencias alélicas para el SNP rs2306283 en los pacientes con TBP fue para el alelo A (wild type) de 0.48 y para el alelo G (mut) de 0.52. Cuando comparamos estas frecuencias con las obtenidas en la base de datos del Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos, muestra una frecuencia alélica de (A=0.565 y G=0.435) bajo el proyecto ALFA para la población sud americana [Phan *et al.*, 2020], así como una frecuencia de (A=0.527 y G=0.473) en el proyecto 1000 GENOMAS para la población americana [1000 Genomes Project Consortium, 2015], las frecuencias resultan muy similares. En la población con TBP y hepatotoxicidad las frecuencias que encontramos son A=0.360 y G=0.640 donde G es más prevalente en este grupo con respecto a los pacientes con solo TBP.

Dompreh y colaboradores en 2018, efectuaron un estudio en Ghana con niños que desarrollaron TB recibiendo el tratamiento de primera línea, genotipando diversos genes metabolizadores de RIF en la población de estudio y buscando la correlación entre ellos y las concentraciones del fármaco, determinaron que el alelo G se asocia con un aumento de RIF en sangre, es decir una disminución en la captación de RIF por el transportador OATP1B1 [Dompreh *et al.*, 2018]; sin embargo, en la construcción de los genotipos se encontró que el 86 % de los pacientes con hepatotoxicidad presentan al menos un alelo G (A/G y G/G) muy similar al 77% de los pacientes con tratamiento y sin toxicidad hepática, datos comparables a los obtenidos por Kim y colaboradores en 2012, en los que encontraron que pacientes Coreanos con genotipos A/G y G/G presentaban una proporción de 90.8% para los pacientes con hepatotoxicidad y de 93% para los pacientes con tratamiento y sin toxicidad hepática, concluyendo que las proporciones entre los pacientes con hepatotoxicidad y los pacientes sin ella se mantienen [Kim *et al.*, 2012].

Respecto a las frecuencias obtenidas en los haplotipos conformados por los SNP's se obtuvo que el haplotipo \*1A (A/T) presentó una frecuencia de 0,466 en los pacientes con TBP y de 0.357 para los pacientes con TBP y hepatotoxicidad; para el haplotipo \*1B (G/T) se obtuvieron frecuencias de 0.429 en los pacientes TBP y de 0.643 para los pacientes con TBP y hepatotoxicidad mostrando estos últimos un OR=2.35 y una p=0.1; En el caso de los haplotipos \*5 (A/C) y \*15 (G/C) se obtuvieron frecuencias de 0.009 y 0.096 para los pacientes con TBP, en el caso de pacientes con TBP y hepatotoxicidad no se encontraron presentes los mencionados haplotipos. Li y colaboradores en población China reportan asociación del haplotipo \*15 en pacientes con TBP y daño hepático de 13.56% vs 6.45% del haplotipo \*1A tiene una frecuencia de 23.22% y de 23.73% en

pacientes con TBP y TBP con hepatotoxicidad respectivamente en el caso del haplotipo \*1B de 70.32% y 61.01% respectivamente y el haplotipo \*5 se encontró sólo en pacientes con TBP y daño hepático con una frecuencia de 1.69%. Por otro lado, el haplotipo \*15 se mostró asociado a pacientes con daño hepático (6.45% vs 13.56%,  $p=0.030$ ,  $OR=2.04$ ,  $IC\ 95\%=1.05-3.96$ ). En la población estudiada la frecuencia del haplotipo\*15 es muy baja en pacientes con TBP (0.096), en los pacientes TBP y daño hepático no se encontró; en otras poblaciones puede ser más frecuente como ya se mencionó. En este estudio el porcentaje de los pacientes con TBP y tratamiento estándar que desarrollan hepatotoxicidad es bajo (2.83%); comparado con porcentajes superiores al 7.8% en Etiopía [Molla, Wubetu & Dessie, 2021], del 11.9% en Corea del Sur [Song *et al.*, 2019] y del 7.90% al 19.90% en la población tailandesa [Khiewkhern *et al.*, 2020]; El trabajo de Na Nakon nos dice que el haplotipo \*5 tiene una frecuencia de 0.008 en población Tai , al comparar por regiones existen diferentes variaciones como en el caso de Li (13.56%). Podemos señalar que las poblaciones asiáticas presentan un porcentaje elevado del haplotipo \*15, en los pacientes con toxicidad hepática, lo que contrasta respecto a la población estudiada (noroeste de México) la cual no presenta dicho haplotipo.

Otro estudio que ratifica nuestros resultados es el realizado por Perea-Jacobo y colaboradores publicado en el año 2022, en población mexicana del estado de Baja California, examinaron los efectos de 8 SNP's presentes en el gen *SLCO1B1*; entre ellos los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 y la concentración máxima ( $C_{max}$ ) de RIF en sangre, en pacientes con tuberculosis. Los resultados obtenidos en dicho estudio no mostraron una asociación entre los SNP's previamente mencionados y la  $C_{max}$  de RIF en los pacientes mexicanos con tuberculosis [Perea-Jacobo *et al.*, 2022], lo cual señala que



nuestros polimorfismos de estudio no afectan de forma directa y significativa la farmacocinética de RIF.

Utilizando el método bioinformático de Docking molecular obtuvimos una comparación entre los posibles cambios de valores en la energía de unión, eficiencia de ligando y la constante de inhibición surgidos por los cambios aminoacídicos provocados por los polimorfismos de nuestro estudio, esto con la finalidad de establecer si dichos cambios aminoacídicos repercuten en alteraciones en las interacciones entre SLCO1B1 y RIF, ya que dichas variaciones pueden afectar la captación del fármaco, lo que conlleva al aumento en la concentración del mismo, pudiendo llegar a producir toxicidad hepática [Kim *et al.*, 2012]; Dichos valores, permanecieron idénticos al compararlos entre el Docking realizado en la proteína transportadora *wild type* y mutada, esto en cada una de las conformaciones obtenidas en el análisis como se puede observar en la figura 14 (D, E y F); sin embargo, dicho experimento se realizó con el modelo computarizado del transportador, esto debido a la inexistencia de su estructura cristalizada; a su vez se requirió de un Docking ciego debido a la falta de información respecto al sitio de interacción o los residuos de aminoácidos que interaccionan entre OATP1B1 y RIF.

Si bien se han determinado diversos factores de riesgo en el desarrollo de hepatotoxicidad por fármacos, el análisis de regresión múltiple señaló como único factor con significancia estadística el tipo de infección que presentaba el paciente (infección primaria o reinfección), descartando factores como la edad, el sexo, la presencia de comorbilidades, la presencia de adicciones, la disminución del peso o el IMC; de hecho como se observa en las figuras 6 a 10, los porcentajes entre los pacientes que presentan hepatotoxicidad y los que no la presentan son similares y varían en porcentajes no

significativos, por otra parte, en la figura 11 se muestra un claro incremento en el porcentaje de pacientes con reinfección entre los pacientes con toxicidad hepática, este incremento respecto a los porcentajes obtenidos en los pacientes sin hepatotoxicidad fue analizado por el método de regresión lineal, obteniendo una significancia estadística válida, sin embargo, el coeficiente de determinación ( $R^2=0.019$ ) mostró una pobre relación causa-efecto entre el tipo de infección presentada y el desarrollo de hepatotoxicidad; si bien no existe un registro de los porcentajes de daño hepático producidos por el retratamiento dado específicamente por la reinfección en los pacientes, si existen estudios que evalúan el efecto del retratamiento con los fármacos de primera línea y el desarrollo de toxicidad hepática, por ejemplo Ataç y colaboradores evaluaron dos regímenes diferentes de reintroducción de fármacos antituberculosos en pacientes turcos, que previamente habían desarrollado daño hepático en el tratamiento, modificando la dosificación de los fármacos en un régimen aumentando la dosificación gradualmente y manteniendo el otro igual a las normativas del tratamiento estándar de primera línea; en dicho estudio se obtuvo una reaparición de hepatotoxicidad en el 24% de los pacientes [Ataç *et al.*, 2001]. En los estudios encontrados [Ataç *et al.*, 2001 & Sharma *et al.*, 2010] se reporta la reaparición de hepatotoxicidad por retratamiento estándar de primera línea, pero no se encontró información respecto a la aparición primaria de hepatotoxicidad por el retratamiento de los pacientes, lo cual nos abre un objeto de estudio en el análisis del desarrollo de toxicidad hepática en los pacientes con tratamiento estándar de primera línea.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIÓN

Por los resultados obtenidos se concluyó que los haplotipos que conforman los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 no se asocian de forma significativa con el desarrollo de hepatotoxicidad en el tratamiento antituberculoso de primera línea, esto debido a que el análisis de la relación de los haplotipos \*1A, \*1B, \*5 y \*15 del gen *SLCO1B1* muestran un valor p global de 0.23 obtenido mediante los programas estadísticos SHEsis y SNPstats, lo que nos indica que la hipótesis planteada en la investigación se rechaza. Se obtuvo un OR de 2.354 [0.777-7.130] para el haplotipo *SLCO1B1*\*1B lo que indica un riesgo mayor de desarrollo de hepatotoxicidad, cuando el haplotipo está presente, sin embargo, esta asociación se vio mermada por el valor p de esta asociación, siendo este de 0.119; este análisis se complementa con los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular, en el cual no se obtuvieron diferencias entre las conformaciones y las energías de unión de los modelos de la proteína con y sin las mutaciones provocadas por los SNP's.

El análisis de los genotipos que conforman los alelos del SNP rs4149056 y del SNP rs2306283 se realizó mediante el método de regresión lineal de forma individual, ambos análisis mostraron que no existe una asociación entre los genotipos T/T, T/C y C/C del SNP rs4149056 con una significancia de 0.394 y un  $R^2$  de 0.003 y los genotipos A/A, A/G y G/G del SNP rs2306283 (con una significancia de 0.199 y un  $R^2$  de 0.007) con el desarrollo de hepatotoxicidad en los pacientes. Respecto a los alelos que conforman

dichos genotipos, se determinó que el alelo A presenta un OR = 0.614 [0.202-1.859], con un valor  $p=0.383$ ; así como de los demás alelos que conforman ambos SNP's muestra nula significancia estadística.

Respecto a la asociación de las variables epidemiológicas y el desarrollo de hepatotoxicidad se encontró por medio del método de regresión lineal simple y múltiple por pasos que los factores de riesgo: edad, sexo, adicciones, comorbilidades, disminución del peso y el índice de masa corporal no se asocian con el desarrollo de daño hepático de los pacientes; sin embargo, el tipo de infección presentó una significancia estadística de 0.032, pero obtuvo un pobre coeficiente de correlación de Pearson de 0.137 y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.019, lo que nos indica que el desarrollo de hepatotoxicidad se explica solo en un 1.9% por el tipo de infección que presenta el paciente, estos resultados avalados por un poder estadístico de 0.999 y un tamaño de efecto de 0.190.

## REFERENCIAS

1. 1000 Genomes Project Consortium. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68.
2. Abid, A., Subhani, F., Kayani, F., Awan, S., & Abid, S. (2020). Drug induced liver injury is associated with high mortality-A study from a tertiary care hospital in Pakistan. *PloS one*, 15(4), e0231398.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231398>
3. Abulfathi, A. A., Decloedt, E. H., Svensson, E. M., Diacon, A. H., Donald, P., & Reuter, H. (2019). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rifampicin in human tuberculosis. *Clinical pharmacokinetics*, 58(9), 1103-1129.
4. AEMPS - CIMA. (2007). Ficha técnica Rifampicina. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios.  
[https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/49034/49034\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/49034/49034_ft.pdf)
5. AEMPS-CIMA. (2022). *FICHA TÉCNICA Rifaldin*. Centro de información online de medicamentos de la AEMPS - CIMA.  
[https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/46028/FichaTecnica\\_46028.html.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/46028/FichaTecnica_46028.html.pdf)
6. Aït Moussa, L., El Bouazzi, O., Serragui, S., Soussi Tanani, D., Soulaymani, A., & Soulaymani, R. (2016). Rifampicin and isoniazid plasma concentrations in relation to adverse reactions in tuberculosis patients: a retrospective analysis. *Therapeutic advances in drug safety*, 7(6), 239-247.

7. Allegra, S., Fatiguso, G., Calcagno, A., Baietto, L., Motta, I., Favata, F., ... & D'Avolio, A. (2017). Role of vitamin D pathway gene polymorphisms on rifampicin plasma and intracellular pharmacokinetics *Pharmacogenomics*, 19(9), 865-880.
8. Andrade, C. H., Salum, L. D. B., Castilho, M. S., Pasqualoto, K. F., Ferreira, E. I., & Andricopulo, A. D. (2008). Fragment-based and classical quantitative structure–activity relationships for a series of hydrazides as antituberculosis agents. *Molecular diversity*, 12(1), 47-59.
9. Ataç, G., Sevim, T., Törün, T., Horzum, G., Gemci, I. M. G. S. R. C. A. L. T. I., Öngel, A.,... & Aksoy, E. (2001). The management of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5(1), 65-69.
10. Beauduy C.E., & Winston L.G. (2019). Fármacos antimicobacterianos. Katzung B.G.(Ed.), *Farmacología básica y clínica*, 14e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2734&sectionid=228359189>
11. Boshoff HI, Mizrahi V, Barry CE 3rd. (2002). Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J Bacteriol.* Apr;184(8):2167-72. doi: 10.1128/JB.184.8.2167-2172.2002. PMID: 11914348; PMCID: PMC134955.
12. CDC. (2021). Tuberculosis (TB). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/tb/default.htm>
13. CENSIDA. (2008). Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH y el sida.

[http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/documentos/Estandares\\_ para\\_la\\_atencion\\_en\\_TB.pdf](http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/documentos/Estandares_para_la_atencion_en_TB.pdf)

14. Chen, R., Wang, J., Tang, S., Zhang, Y., Lv, X., Wu, S., ... & Zhan, S. (2015). Key factors of susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Archives of toxicology*, 89(6), 883-897.
15. Cubero, C. (2018). NL, en «top 10» nacional de casos de tuberculosis. MILENIO. <https://www.milenio.com/ciencia-y-salud/sociedad/nl-top-10-nacional-casos-tuberculosis>.
16. Día Mundial de la Tuberculosis 2022. (2022). En *who*. Recuperado 3 de octubre de 2022, de <https://www.who.int/es/campaigns/world-tb-day/2022#:~:text=D%C3%ADa%20Mundial%20de%20la%20Tuberculosis%202022,Tertulia%20en%20la%20mañana&text=La%20Organizaci%C3%B3n%20Mundial%20de%20la,poner%20fin%20a%20la%20tuberculosis>.
17. Dompok, A., Tang, X., Zhou, J., Yang, H., Topletz, A., Ahwireng, E. A. & Kwara, A. (2018). Effect of genetic variation of NAT2 on isoniazid and SLCO1B1 and CES2 on rifampin pharmacokinetics in Ghanaian children with tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(3).
18. Dorronsoro, I., & Torroba, L.. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(Supl. 2), 67-85. Recuperado en 09 de abril de 2021, de
19. Drugbank.ca. 2022. *DrugBank: Etambutol*. [online] Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00330> [Acceso 02 octubre 2022].
20. Drugbank.ca. 2022. *DrugBank: Pyranzinamide*. [online] Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00339> [Acceso 02 octubre 2022].

21. Drugbank.ca. 2022. *DrugBank: Rifampicin*. [online] Available at: < <https://go.drugbank.com/drugs/DB01045> > [Acceso 05 febrero 2023].
22. Golemba, A. S., Ferreyra, F. G., Martearena, R. E., Achinelli, F. R., & Rovai, G. B. (2015). Drug-induced hepatotoxicity and tuberculosis in a hospital from the Argentinian northeast: cross-sectional study. *Medwave*, 15(4), e6135-e6135.
23. Gómez-Tangarife, V. J., Gómez-Restrepo, A. J., Robledo-Restrepo, J., & Hernández-Sarmiento, J. M. (2018). Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: contribution of constituent and acquired mechanisms. *Revista de Salud Pública*, 20(4), 491-497.
24. Gordin, F. M., Cohn, D. L., Matts, J. P., Chaisson, R. E., Brien, R. J. O., & Terry Beirn Community Programs for Clinical Research on AIDS, the Adult AIDS Clinical Trials Group, and the Centers for Disease Control and Prevention. (2004). Hepatotoxicity of rifampin and pyrazinamide in the treatment of latent tuberculosis infection in HIV-infected persons: is it different than in HIV-uninfected persons?. *Clinical infectious diseases*, 39(4), 561-565.
25. Gumbo, T., Louie, A., Deziel, M. R., Liu, W., Parsons, L. M., Salfinger, M., & Drusano, G. L. (2007). Concentration-dependent *Mycobacterium tuberculosis* killing and prevention of resistance by rifampin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), 3781.
26. H. Congreso del Estado de Nuevo León. (2022, febrero). *PIDE PRI GARANTIZAR TRATAMIENTO COMPLETO CONTRA TUBERCULOSIS*. Grupo Legislativo PRI. Recuperado 1 de octubre de 2022, de <https://www.hcnl.gob.mx/glpri/2022/02/pide-pri-garantizar-tratamiento-completo-contra-tuberculosis.php>



27. HIVinfo. (2021). La infección por el VIH y la hepatotoxicidad. En *HIVinfo.NIH.gov*. Recuperado 10 de enero de 2023, de <https://acortar.link/YOVujJ>  
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272007000400006&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000400006&lng=es&tlng=es).
28. Jin, S., Li, X., Fan, Y., Fan, X., Dai, Y., Lin, H. ... & Xiang, X. (2019). Association between genetic polymorphisms of SLCO1B1 and susceptibility to methimazole-induced liver injury. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 125(6), 508-517.
29. Kaboli, P. J., Ismail, P., & Ling, K. H. (2018). Molecular Docking-An easy protocol.
30. KHIEWKHERN, S., RUETRAKUL, J., THONGKUM, W., & AREERUK, N. (2020). Factors Enhancing Drug-induced Hepatotoxicity among Thai Patients with TB. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 14(9).
31. Kim, J. H., Nam, W. S., Kim, S. J., Kwon, O. K., Seung, E. J., Jo, J. J., ... & Lee, S. (2017). Mechanism investigation of rifampicin-induced liver injury using comparative toxicoproteomics in mice. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1417.
32. Kim, S. H., Kim, S. H., Lee, J. H., Lee, B. H., Kim, Y. S., Park, J. S., & Jee, Y. K. (2012). Polymorphisms in drug transporter genes (ABCB1, SLCO1B1 and ABCC2) and hepatitis induced by antituberculosis drugs. *Tuberculosis*, 92(1), 100-104.
33. Kuehn, B. M. (2009). FDA Focuses on Drugs and Liver Damage. *Jama*, 302(4), 369-371.

34. Lee, H. H., & Ho, R. H. (2017). Interindividual and interethnic variability in drug disposition: polymorphisms in organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1; SLCO1B1). *British journal of clinical pharmacology*, 83(6), 1176-1184.
35. Li, L. M., Chen, L., Deng, G. H., Tan, W. T., Dan, Y. J., Wang, R. Q., & Chen, W. S. (2012). SLCO1B1\* 15 haplotype is associated with rifampin-induced liver injury. *Molecular medicine reports*, 6(1), 75-82.
36. Lönnroth, K., Williams, B. G., Stadlin, S., Jaramillo, E., & Dye, C. (2008). Alcohol use as a risk factor for tuberculosis—a systematic review. *BMC public health*, 8(1), 1-12.
37. Manuales MSD. (2020). Rifamicinas. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/rifamicinas>
38. Mitchell, I., Wendon, J., Fitt, S., & Williams, R. (1995). Anti-tuberculous therapy and acute liver failure. *The Lancet*, 345(8949), 555-556.
39. Molla, Y., Wubetu, M., & Dessie, B. (2021). Anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity and associated factors among tuberculosis patients at selected hospitals, Ethiopia. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 13, 1.
40. Nakanorn, C., Waisyarat, J., Dejthevaporn, C., Srisawasdi, P., Wongwaisayawan, S., & Sukasem, C. (2020). Genetic variations and frequencies of the two functional single nucleotide polymorphisms of SLCO1B1 in the Thai population. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 728.

41. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 135398735, Rifampicin. Recuperado el 9 de abril del 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifampicin>.
42. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 135398735, Rifampicin. Recuperado el 19 de octubre del 2022 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifampicin>.
43. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2022. Haplotype[online] <<https://www.genome.gov/es/geneticsglossary/Haplotipo#:~:text=Un%20haplotipo%20es%20una%20agrupaci%C3%B3n,la%20otra%20en%20un%20cromosoma.>> [Acceso 01 de octubre del 2022].
44. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2022. Polymorphisms [online] < <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Polimorfismo> > [Acceso 01 de octubre del 2022].
45. Niemi, M., Pasanen, M. K., & Neuvonen, P. J. (2011). Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacological reviews*, 63(1), 157-181.
46. NIH. (2019). Rifampicina: MedlinePlus medicinas. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682403-es.html>.
47. PAHO. (2019). Tuberculosis-PAHO. Pan American Health Organization. <https://n9.cl/79ar>
48. Perea-Jacobo, R., Muñoz-Salazar, R., Laniado-Laborín, R., Zenteno-Cuevas, R., Cabello-Pasini, A., Ochoa-Terán, A., & Radilla-Chávez, P. (2022). SLCO1B1 and SLC10A1 polymorphism and plasma rifampin concentrations in patients with

- co-morbidity tuberculosis-diabetes mellitus in Baja California, Mexico. *Tuberculosis*, 136, 102248.
49. Phan, L., Jin, Y., Zhang, H., Qiang, W., Shekhtman, E., Shao, D., ... & Kattman, B. L. (2020). ALFA: allele frequency aggregator. *National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine*, 10.
50. Prasad, R., Singh, A., & Gupta, N. (2019). Adverse drug reactions in tuberculosis and management. *indian journal of tuberculosis*, 66(4), 520-532.
51. Robledo, M., Torres, I., Manrique, R. D., Duque, M., & Gallo, J. E. (2019). Utilidad del gen SLCO1B1 como marcador de interés en la farmacogenómica de las estatinas. *Revista Colombiana de Cardiología*, 26(1), 24-30.
52. Roszkiewicz, J., Michałek, D., Ryk, A., Swacha, Z., Szmyd, B., & Smolewska, E. (2021). SLCO1B1 variants as predictors of methotrexate-related toxicity in children with juvenile idiopathic arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 50(3), 213-217.
53. Ryan K.J., & Ray C (Eds.), (2017). *Micobacterias. Sherris. Microbiología médica*, 6e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169&sectionid=162983157>
54. Samper, S., & González-Martin, J. (2018). Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por el género *Mycobacterium*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(2), 104-111.
55. Secretaría de Salud. (2013) NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis.

56. Sharma, S. K., Singla, R., Sarda, P., Mohan, A., Makharia, G., Jayaswal, A., ... & Singh, S. (2010). Safety of 3 different reintroduction regimens of antituberculosis drugs after development of antituberculosis treatment-induced hepatotoxicity. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 833-839.
57. Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry 3rd, C. E. ... & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 333(6049), 1630-1632.
58. Song, J. H., Yoon, S. Y., Park, T. Y., Heo, E. Y., Kim, D. K., Chung, H. S., & Lee, J. K. (2019). The clinical impact of drug-induced hepatotoxicity on anti-tuberculosis therapy: a case control study. *Respiratory Research*, 20(1), 1-8.
59. Sun, Q., Liu, H. P., Zheng, R. J., Wang, P., Liu, Z. B., Sha, W., & Xiao, H. P. (2017). Genetic polymorphisms of SLCO1B1, CYP2E1 and UGT1A1 and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: a Chinese population-based prospective case-control study. *Clinical Drug Investigation*, 37(12), 1125-1136.
60. Thomas, L., Sekhar Miraj, S., Surulivelrajan, M., Varma, M., Sanju, C. S., & Rao, M. (2020). Influence of single nucleotide polymorphisms on rifampin pharmacokinetics in tuberculosis patients. *Antibiotics*, 9(6), 307.
61. 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(1), 62-69.
62. Tostmann, A., Boeree, M. J., Aarnoutse, R. E., De Lange, W. C., Van Der Ven, A. J., & Dekhuijzen, R. (2008). Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity:

- concise up-to-date review. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(2), 192-202.
63. Tuberculosis. (2021). En *who*. Recuperado 1 de octubre de 2022, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis#:~:text=Un%20total%20de%201%2C4,encima%20del%20VIH%2Fsida>).
64. Tuerkova, A., Ungvári, O., Laczkó-Rigó, R., Mernyák, E., Szakács, G., Özvegy-Laczka, C., & Zdrzil, B. (2021). Data-Driven ensemble docking to map molecular interactions of steroid analogs with hepatic organic anion transporting polypeptides. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(6), 3109-3127.
65. Tweed, C. D., Wills, G. H., Crook, A. M., Dawson, R., Diacon, A. H., Louw, C. E.,... & Gillespie, S. H. (2018). Liver toxicity associated with tuberculosis chemotherapy in the REMoxTB study. *BMC medicine*, 16(1), 1-10.
66. Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., & Vivas-Reyes, R. (2013). Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de Acoplamiento Molecular. *Revista colombiana de química*, 42(1), 101-124.
67. WHO. (2020). Tuberculosis. Organización Mundial de la Salud. <https://n9.cl/vfchv>
68. Wistrand-Yuen, E., Knopp, M., Hjort, K., Koskiniemi, S., Berg, O. G., & Andersson, D. I. (2018). Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
69. Zhang, Z., Dai, F., Luo, F., Zhong, M., Huang, Z., Hou, T., & Xu, J. (2014). Could high-concentration rifampicin kill rifampicin-resistant *M. tuberculosis*? Rifampicin MIC test in rifampicin-resistant isolates from patients with

osteoarticular tuberculosis. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 9(1), 1-5.

70. Ferraz, B. R., Leite, F. R., & Malagutti, A. R. (2016). Highly sensitive electrocatalytic determination of pyrazinamide using a modified poly (glycine) glassy carbon electrode by square-wave voltammetry. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 20, 2509-2516.

71. Abbasi, N. M., Kobarfard, F., Tabarsi, P., Azimi, M., & Salamzadeh, J. (2009). Effect of antituberculosis regimen containing ethambutol on serum magnesium level in pulmonary tuberculosis patients.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Material, reactivos y equipo

#### Material biológico

- DNA genómico aislado a partir de muestra sanguínea de los pacientes.

#### Materiales e instrumental utilizados en la realización del experimento.

- Puntillas blancas para micropipeta de 0.1 a 2.5uL
- Puntillas amarillas para micropipeta de 2 a 20uL, 10 a 100uL
- Puntillas azules para micropipeta de 100 a 1000uL
- Pipetas de vidrio de 10mL
- Tubos de plástico de 200, 600 y 1500uL.
- Tubos de plástico de 15 y 50mL.
- Tubo recubierto con EDTA
- Micropipeta de 0.1 a 2.5uL.
- Micropipeta de 2 a 20uL.
- Micropipeta de 10 a 100uL.
- Micropipeta de 100 a 1000uL.



Reactivos utilizados en la realización del experimento.

- Mezcla de PCR cuantitativa absoluta
- Mezcla de cebadores y sondas TaqMan
- Kit para extracción de ADN genómico

Equipos utilizados en la realización del experimento.

El laboratorio de Inmunogenética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), lugar donde se efectuó el trabajo experimental, cuenta con la infraestructura básica para el buen desarrollo del proyecto, entre ellos podemos mencionar: termocicladores en tiempo real, centrifugas, incubadoras, refrigeradores, congeladores, vórtex, fotodocumentador, equipo de electroforesis, espectrofotómetro y computadora.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Oscar Arturo Ramos Silva

Candidato para el grado de

Maestro en ciencias con orientación en farmacia

Tesis: Asociación de los polimorfismos rs4149056 y rs2306283 del gen *SLCO1B1* y la susceptibilidad al desarrollo de daño hepático en pacientes del noreste de México con tuberculosis pulmonar con tratamiento estándar de primera línea.

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía:

Nacido en Delicias, Chihuahua, el 04 de julio de 1996, hijo de Álvaro Rene Ramos Ibarra y Cirse Leonor Silva Arrieta.

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Licenciado en Biotecnología Genómica.

Experiencia en laboratorio:

Capacidad de realizar pruebas microbiológicas y de biología molecular, así como manejo de bases de datos de bioinformática, experiencia en trabajo de investigación, trabajo de laboratorio con cultivo de células humanas, manejo de muestras y coordinación en el laboratorio.