



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TÍTULO DEL TRABAJO

***“EVALUACIÓN DEL ESTADO EPIGENÉTICO DE LAS
N-ACETILTRANSFERASAS NAT1 Y NAT2 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

M. en C. Oswaldo Hernández González

Director de tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Asesores Internos

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia

Dra. Edith Elena Uresti Rivera

Asesor Externo

Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

Asesor Clínico

Dr. Juan José Ortiz Zamudio



Proyecto realizado en:

Departamento Hemato–Oncología Pediátrica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Laboratorio de Medicina Molecular y Traslacional del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



El programa de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 003383.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 331466

CVU: 628507



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TÍTULO DEL TRABAJO

**“EVALUACIÓN DEL ESTADO EPIGENÉTICO DE LAS
N-ACETILTRANSFERASAS NAT1 Y NAT2 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

M. en C. Oswaldo Hernández González

SINODALES

PRESIDENTE

Dra. Diana Patricia Portales

SECRETARIO

Dra. Rosa Del Carmen Milán Segovia

VOCAL

Dra. Edith Elena Uresti Rivera

VOCAL

Dr. Juan Manuel Vargas Morales

VOCAL

Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

San Luis Potosí, S.L.P.

OCTUBRE 2020

No te avergüences por tus fracasos; aprende de ellos y comienza de nuevo.

Richard Branson

“Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora. Tiempo de nacer, y tiempo de morir; tiempo de plantar, y tiempo de arrancar lo plantado; tiempo de matar, y tiempo de curar; tiempo de destruir, y tiempo de edificar; tiempo de llorar, y tiempo de reír; tiempo de endechar, y tiempo de bailar; tiempo de esparcir piedras, y tiempo de juntar piedras; tiempo de abrazar, y tiempo de abstenerse de abrazar; tiempo de buscar, y tiempo de perder; tiempo de guardar, y tiempo de desechar; tiempo de romper, y tiempo de coser; tiempo de callar, y tiempo de hablar; tiempo de amar, y tiempo de aborrecer; tiempo de guerra, y tiempo de paz”.

Eclesiastés 3

Aprendí que un tropezón no es una caída...

Que todo en la vida vuelve...

Que no hay mal que por bien no venga...

Con voluntad y esfuerzo, todo resulta más fácil...

Que lo más valioso en el mundo es, la familia y los amigos de verdad...

Que no se llora a quien no te valora...

Que, por más tropezón, caída u obstáculo, o barrera que se interponga en el camino, el objetivo es levantar la cabeza y SEGUIR ADELANTE...

Autor desconocido

AGRADECIMIENTOS

- A todos los pacientes pediátricos y a sus respectivos familiares del departamento de Hemato–Oncología Pediátrica, del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, que pese a la difícil situación que enfrentan, me brindaron su confianza para la realización de este proyecto.
- A los niños aparentemente sanos por su valiosa colaboración en este proyecto, así como a sus padres por su confianza y apoyo.
- A mis padres que, pese a las adversidades, retos e inclusive nuestras diferencias, siempre me han apoyado en mis decisiones.
- A mi tía Rosy, por su valiosa amistad y ayuda, así como su cariño en todo momento.
- A la Dra. Diana Portales, por aceptarme como su estudiante de doctorado y haberme permitido realizar este proyecto.
- A la Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia, por su apoyo y cariño, así como su asesoría brindada en este proyecto.
- A la Dra. Edith Elena Uresti Rivera por su apoyo, amistad y gran paciencia brindadas en el desarrollo de este proyecto.
- Al Dr. Juan Manuel Vargas Morales por sus consejos brindados en estos 4 años, así como su amistad.
- Al Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré por su participación en el proyecto.
- Al M. en C. Daniel Zavala Reyes por su amistad, así como su asesoría en el citómetro y análisis t-SNE y la experiencia del congreso de Puebla (sabes de que hablo).
- A la QFB. Diana Judith Herrera Vargas, por su amistad y paciencia en el equipo NAT’s así como su apoyo en la realización de este proyecto.
- Al Dr. José Ignacio Veytia Bucheli por su amistad brindada en el CICSAB.
- A Ricardo Ramírez (Richie) y Alan Orlando Santos Mena por los buenos momentos en el laboratorio.
- A Francisco Javier García Torres por confiar en mí y permitirme ser parte de su desarrollo profesional con la enseñanza de HPLC.
- A mis amigos de la carrera Liz, Eloísa, Israel, Aida y Cinthia.
- A Gibran Gael Velázquez, Jorge Hurtado, Andrea Vargas y Clara Sánchez Félix por las asesorías nocturnas en momentos de crisis.

- A las profesoras MC. Ma. Esther Flores Moreno, MC. Lorena Loredó Hernández y QFB. Cristian Jazmín Rodríguez Pinal, por hacer más amigable mi estadía en el Laboratorio de Biofarmacia.
- Al CONACYT por la Beca otorgada.
- Al Dr. Juan José Ortiz por su valiosa participación y asesoría en la parte clínica del proyecto, por siempre dedicarme un momento de su tiempo cuando tenía dudas.
- A la Dra. Lourdes Cecilia Correa González, por respaldar el desarrollo del proyecto y su disposición para colaborar.
- A las enfermeras Carmelita y Judith, por su gran apoyo en la parte clínica del proyecto, por sus consejos, paciencias y ánimos en todo momento que estuve en el departamento de Hemato–Oncología Pediátrica.
- A la familia Calva Hernández, por su auxilio durante mi estancia en el INCAN.
- A Gilberto Reyes por ser mi columna en CDMX.
- A la Sra. María Guadalupe Silvia Zarate Hernández, por su apoyo y afecto en estos 4 años (la extraño mucho).
- A la QFB. Pura Concepción González Castilla, quien me brindó un espacio en su hogar, cuando el trabajo no me permitía llegar al mío.
- A la profesora Ma. del Carmen Pérez Coss por su cariño, apoyo, compañía y aprecio en el CICSAB.
- A Arturo, Jesús Rafael Rodríguez (Japo), Luis Galván (Padrino) y Bosco (Padawan) por tolerar mi loquera todo este tiempo y por su apoyo en la tesis.
- A todos los que me dieron un abrazo que sin decirlo sabían que lo necesitaba, un ánimo en estos 4 años de duro trabajo.

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en población infantil y actualmente su etiología continua en investigación. Se ha propuesto que la presencia de polimorfismos en los genes de las N-Acetiltransferasas (NATs) NAT1 y NAT2 son un factor causal; además, no se conocen los niveles de expresión y actividad de las NATs en células inmunes de pacientes con LLA. En este trabajo, se aislaron células mononucleares de sangre venosa periférica de un grupo control donde se incluyó niños sanos (n= 19) y un grupo de pacientes con LLA (n=20). Se determinó la expresión de ARNm por PCR en tiempo real, el porcentaje de células positivas para NAT1 y NAT2 por citometría de flujo y la actividad enzimática mediante un cultivo celular con sustrato específico por HPLC. Se observaron niveles bajos de expresión de NAT1 a nivel de ARNm ($p=0.001$) y de proteína ($p=0.0003$) en los pacientes con LLA, así como en la actividad enzimática ($p=0.0047$) cuando se comparó con el grupo control. En linfocitos T CD3⁺ se detectó una baja expresión de NAT1, principalmente en aquellos pacientes que presentaron recaída a la neoplasia. Mediante ensayos de CHIP se encontró una menor acetilación de histonas en el promotor de NAT1, lo que podría explicar la baja expresión del ARNm. Cuando se analizó NAT2, se detectó una menor expresión a nivel de proteína solo en células CD3⁺ (linfocitos T) ($p=0.04$). En conclusión, la enzima metabolizadora de fármacos NAT1 podría ser considerada como un factor de mal pronóstico en la LLA y podría influir en el desarrollo de la neoplasia.

Palabras clave: Leucemia, NAT1, NAT2, expresión, actividad enzimática.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common neoplasm in children and whose etiology continues to be studied. N-Acetyltransferases are drug-metabolizing enzymes, and NAT1 participates in carcinogenesis. The expression and activity levels of NAT1 or NAT2 in ALL are unknown. Therefore, expression at the level of mRNA and protein was evaluated, as well as the enzymatic activity of NAT1 and NAT2 in pediatric patients with ALL and apparently healthy children. Peripheral venous blood mononuclear cells (PBMC) were isolated in a control group (n=19) and with ALL (n=20, 7 presented relapse). mRNA was evaluated by real-time PCR and the percentage of cells positive for NAT1 and NAT2 by flow cytometry; enzymatic activity was determined by HPLC from a cell culture with the specific substrate. Low levels of NAT1 mRNA expression (p=0.001) and protein (p=0.0003), as well as enzymatic activity (p=0.0047) were observed in PBMC from children with ALL compared to the control group. Through the t-SNE analysis, NAT1 was found to have lower expression in CD3⁺ lymphocytes of patients who relapsed with respect to the first diagnosis. NAT1 is present only in CD19⁺ lymphocytes in the control group, but not in ALL patients with relapse. The CHIP assays showed less histone acetylation in the NAT1 promoter, which could explain the low expression of mRNA. In contrast, NAT2 showed similar levels of mRNA expression (p=0.51) but higher level of protein expression in CD3⁺ lymphocytes (p=0.04) of patients with ALL than in the control group, however, the enzyme activity was similar between the groups (p=0.2). The results indicate that NAT1 could be used as a poor prognostic factor and that it could influence the development of the neoplasia.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
2.1 Objetivo General	2
2.2 Objetivos Específicos.....	2
3. Material y métodos	3
4. Resultados y discusión.....	5
5. Conclusiones	6

“EVALUACIÓN DEL ESTADO EPIGENÉTICO DE LAS N-ACETILTRANSFERASAS NAT1 Y NAT2 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”

1. Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna que se diagnostica con mayor frecuencia en pacientes pediátricos. Se presenta con mayor número de incidencia entre los 3 y 5 años de edad y representa del 25 al 30% de todos los tipos de neoplasias malignas infantiles. México es el segundo país de América Latina con mayor número de casos de prevalencia e incidencia de LLA (1). Se desconocen las causas de la alta incidencia, sin embargo, se ha propuesto que las enzimas que participan en el proceso de detoxificación podrían influir en el desarrollo de la enfermedad. Dentro de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos, se encuentran las Arilaminas N-Acetiltransferasas (NATs), NAT1 y NAT2. Los genes que codifican para estas enzimas son altamente polimórficos, lo que genera 3 fenotipos de acetilación: lento, rápido e intermedio. Los acetiladores lentos de NAT2 son menos eficientes en el metabolismo de aminas aromáticas, esto ocasiona que dichas moléculas permanezcan más tiempo en el organismo, lo cual podría favorecer la generación de aductos en el ADN y causando mutaciones. Por otra parte, los acetiladores rápidos NAT1 convierten, en una mayor proporción, los compuestos xenobióticos (compuestos tóxicos, específicamente) a productos altamente reactivos, lo que podría ocasionar que exista una alta probabilidad de presentarse mutaciones debido a la formación de aductos de ADN (2). Estudios recientes llevados a cabo en una línea celular derivada de adenocarcinoma de colon (HT-29) asocian a NAT1 con el proceso de carcinogénesis debido a su participación en la regulación de la expresión de p53 (3). Además, utilizando una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231), se demostró que la sobreexpresión de NAT1 tiene como resultado la disminución en la cantidad de Acetil coenzima A, acumulándose Coenzima A, lo cual podría inducir apoptosis por las altas concentraciones de este compuesto o bien, alterar otros mecanismos celulares debido a la participación de la acetil coenzima A en diversos procesos fisiológicos (4).

Nuestro grupo de investigación determinó que existen asociaciones con los haplotipos *NAT1*4* (OR=1.92), *NAT2*6B* (OR=3.3) (590G>A), *NAT2*6J* (OR=3.25) (282C>T,590G>A, 857G>A) y *NAT2*7A* (OR=2.45) (857 G>A) en pacientes pediátricos con LLA mestizos mexicanos (5). Sin embargo, se desconocen los niveles de expresión y regulación a nivel de proteína, ARNm y de actividad enzimática en esta neoplasia, los cuales podrían verse alterados en pacientes con LLA y por lo tanto, estos datos contribuirían con información clave que podría elucidar la etiología de esta neoplasia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el estado de metilación del ADN y el de acetilación y metilación de histonas en los promotores de los genes *NAT1* y *NAT2* y asociarlos con los niveles de expresión y función del gen y de la enzima en células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC) de sujetos control y pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda.

2.2 Objetivos Específicos

- Analizar el patrón de metilación de ADN en los promotores de los genes NAT's en PBMC de sujetos control y pacientes con leucemia linfoblástica aguda mediante la técnica de PCR en tiempo real y secuenciación por bisulfito.
- Evaluar el estado de acetilación y metilación de histonas en los promotores de los genes *NATs* en PBMC de sujetos control y pacientes con leucemia linfoblástica aguda mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP).
- Determinar la expresión de *NATs* a nivel ARNm y proteína en PBMC por PCR en tiempo real y citometría de flujo en sujetos control y pacientes con leucemia linfoblástica aguda.
- Evaluar la actividad de las enzimas *NATs* por cultivo celular con sustratos específicos en PBMC de sujetos control y pacientes con leucemia linfoblástica aguda mediante la técnica de HPLC.
- Realizar el análisis de asociación de patrón de metilación de ADN y el de acetilación y metilación de histonas con los niveles de expresión y actividad enzimática de las *NATs*.

3. Material y métodos

El presente trabajo fue un estudio observacional, transversal, piloto, analítico y prospectivo. El protocolo se aprobó por los Comités de Investigación y de Ética en investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (HCDIMP) (Registro 25-17). Participaron pacientes del Área de Oncopediatría y Servicio de Pediatría, atendidos en el HCDIMP, que cumplieron con los criterios de inclusión de este estudio. Se obtuvo el consentimiento informado del padre o tutor y el asentimiento si el menor era mayor de 12 años de edad hasta los 17 años, 11 meses y 29 días.

3.1 Toma de muestras biológicas y aislamiento de células Mononucleares

Para ambos grupos se tomó, mediante una venopunción al momento de estudios de rutina de los participantes, una muestra única de 4 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA. Se aislaron las PBMC por gradiente de densidad mediante Ficoll-Hypaque, las cuales se emplearon para los distintos ensayos.

3.2 Ensayo de inmuno precipitación de la cromatina (CHIP)

Las PBMC se fijaron con formaldehído al 1% y posteriormente se sonicaron en el equipo EpiSonic™ 2000 Sonication System, para obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 300-700 pb. Los complejos de proteína-ADN se inmunoprecipitaron con perlas magnéticas (Dynabeads Protein G, ThermoFisher) y los anticuerpos anti-histona H3 (Abcam® ab1791), anti-histona H3 trimetil K27 (Abcam® ab6002) y anti-acetilhistona H3 (K14) (Merck Millipore®). El ADN inmunoprecipitado se purificó y se utilizó para realizar los ensayos de PCR.

3.3 Expresión del ARNm

El ARN se obtuvo de las PBMC utilizando TRIzol® (Thermo Fisher Scientific®). La síntesis de ADN complementario se realizó con el ensayo comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®). La expresión relativa del ARNm se midió mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR Green qPCR Master Mixes (Thermo Fisher Scientific) y empleando β -actina como gen endógeno. El nivel de expresión se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.4 Determinación de la expresión de proteína

La cantidad de proteína de cada enzima en las PBMC se determinó mediante citometría de flujo utilizando el equipo FACSCanto II instrument (Beckton-Dickinson). Se emplearon anticuerpos específicos de superficie específicos para CD3-PE (Clona HIT3a) y CD19-FITC (Clona HIB19) (eBiosciences®). Para determinar la expresión de las proteínas NAT1 y NAT2, las células se fijaron y se permeabilizaron utilizando el ensayo comercial Fixation/Permeabilization (eBiosciences®) y se utilizaron los anticuerpos intracelulares: NAT1-APC y NAT2-APC (ab109114 y ab88443 Abcam®). Los resultados obtenidos se analizaron en el programa FlowJo Versión 10.4.

3.5 Determinación de la actividad enzimática por HPLC

Las PBMC se cultivaron en medio RPMI® en placas de ELISA de 48 pozos por 24 horas con los respectivos sustratos. Para NAT1 se empleó como sustrato el ácido para-amino benzoico (Sigma Aldrich®) y para NAT2 se empleó como sustrato Isoniazida (Sigma Aldrich®). La fase móvil consistió en 80% de ácido acético 50 mM y 20% de acetonitrilo, a una λ de 270 nm para NAT1, y 97% de Heptanosulfonato de sodio 20 mM con Buffer de fosfatos 2.5 mM y 3% acetonitrilo a una λ de 266 nm para NAT2. 20 μ L de muestra se analizaron mediante la técnica de HPLC. El equipo que se utilizó fue el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Waters System, Milford, MA, USA) con detector UV-Vis Waters modelo 2487. La columna y precolumna empleadas fueron de la marca Waters X-terra RP18.

3.6 Análisis estadístico

Cuando los datos fueron paramétricos, se compararon las medias mediante la prueba de T-Student; si los datos resultaron no paramétricos, se compararon las medianas con U de Mann-Whitne,. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism V 7.00 (Graphpad Software Inc., CA, USA).

4. Resultados y discusión

En este estudio participaron 19 niños control (10 hombres y 9 mujeres) entre los 4 y 15 años; y 20 niños con LLA (12 hombres y 8 mujeres) entre los 3 y 15 años. Del grupo de niños con LLA, 19 se clasificaron como pacientes de alto riesgo y 1 como paciente de riesgo habitual. 7 de los 20, presentaron recaída. Todos los pacientes fueron diagnosticados como LLA del tipo B por el oncólogo pediatra. La mayoría de los pacientes se encontraban en fase de mantenimiento (n=17), uno en consolidación y dos en reinducción al tratamiento. La clasificación EGIL mostró lo siguiente; EGIL B1 (n=2), EGIL B2 (n=9) y EGIL B3 (n=9).

Nuestros resultados muestran que existe una disminución en la expresión del ARNm ($p=0.001$) y de la proteína NAT1 en términos de valores absolutos ($p=0.0003$) en pacientes con LLA respecto al grupo control.

Los ensayos de evaluación de la actividad enzimática de NAT1 demostraron que existe una expresión baja de la misma en pacientes con LLA ($p=0.0047$), incluso, algunos sujetos presentaron actividad nula. Estos resultados coinciden con reportes en líneas celulares de leucemia (THP-1, Jurkat o CEM), cáncer de hígado (HepG2) y colon (HT-29); en contraste, en líneas celulares de cáncer de mama (T-47D, ZR-751) y próstata (LNCaP, 22RV1) se ha reportado que la actividad de NAT1 se encuentra elevada. Se desconocen las causas de este comportamiento opuesto, sin embargo, las modificaciones postraduccionales y/o los mecanismos epigenéticos, los cuales varían entre distintos tipos de cáncer podrían estar jugando un papel importante.

La baja expresión y actividad de NAT1 podría ser un factor influyente en el proceso de carcinogénesis, debido a que podrían existir grandes concentraciones intracelulares de Acetil coenzima A, lo cual favorece la proliferación celular. Por lo tanto, es necesario evaluar las concentraciones de este cofactor en células leucémicas.

El análisis de expresión de NAT1 en linfocitos T CD3⁺, determinó que aquellos que mostraban baja expresión de NAT1, se caracterizaban por presentar recaída a la neoplasia, lo que nos sugiere que una disminución en la expresión de NAT1 en esta subpoblación celular podría ser utilizado como un factor de mal pronóstico. Los resultados del ensayo de CHIP, mostraron en un paciente con LLA disminución de los

niveles de acetilación en histona H3 lisina 14 (H3K14ac) en el promotor de NAT1 respecto al sujeto control, lo cual podría explicar la menor expresión del mensajero. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos de estudio en la expresión del ARNm, proteína y actividad enzimática cuando se analizó NAT2. Sin embargo, en el ensayo de CHIP se detectaron menores de niveles de acetilación en H3K14ac y mayores niveles de metilación en histona 3 lisina 27 (H3K27me3) en un paciente con LLA respecto al sujeto control, aunque no se reflejara el efecto en la supresión del mensajero. Sin embargo, la cromatina analizada fue proveniente de PBMC, con base a los resultados de citometría de flujo, es necesario realizar el estudio de CHIP por subpoblación celular (T y B) específica. En contraste, los niveles de células dobles positivas CD3⁺/NAT2⁺ ($p=0.04$) fueron mayores en pacientes con LLA. El resultado obtenido fue opuesto al esperado, ya que NAT2 es afín a la reacción de N-acetilación, una reacción que provee un efecto protector al desarrollo de cáncer, ya que se favorece la detoxificación de los xenobióticos.

5. Conclusiones

El presente estudio describe por primera vez la expresión y actividad enzimática de NAT1 y NAT2 en PBMC de pacientes con LLA. Nuestros datos indican que la expresión de NAT1 en linfocitos CD3⁺ podría ser un factor de mal pronóstico en los pacientes con LLA y que las alteraciones encontradas en esta enzima podrían influir en el desarrollo de cáncer, ya que se ha descrito a NAT1 con una posible influencia en la regulación del ciclo celular. Para NAT2 no se detectaron alteraciones en los distintos ensayos realizados en las PBMC de los pacientes con LLA.

6. Bibliografía

1. Jiménez-Morales S, Hidalgo-Miranda A, Ramírez-Bello J. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2017;74(1):13-26.
2. Jančová P, Šiller M. Phase II Drug Metabolism. *Topics on Drug Metabolism, InTech2012.* p. 35-60.
3. Wang L, Minchin RF, Butcher NJ. Arylamine N-acetyltransferase 1 protects against reactive oxygen species during glucose starvation: Role in the regulation of p53 stability. *PLoS One.* 2018;13(3):e0193560.
4. Carlisle SM, Trainor PJ, Yin X, Doll MA, Stepp MW, States JC, et al. Untargeted polar metabolomics of transformed MDA-MB-231 breast cancer cells expressing varying levels of human arylamine N-acetyltransferase 1. *Metabolomics.* 2016;12(7):111.
5. Hernández-González O, Ortiz-Zamudio JJ, Rodríguez-Pinal CJ, Alvarado-Morales I, Martínez-Jiménez VdC, Salazar-González RA, et al. Genetic polymorphisms of arylamine N-acetyltransferases 1 and 2 and the likelihood of developing pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2018;59(8):1968-75.