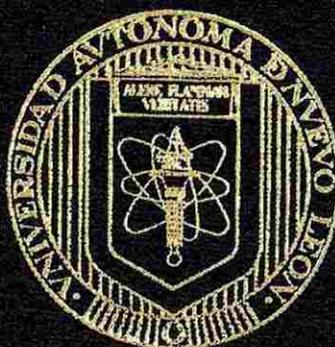


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



TITULO DE LA TESIS

ASOCIACION DEL PATRON Y POLIMORFISMOS DE  
CD11c, CD14 Y TLR4 CON LA SUSCEPTIBILIDAD A  
DESARROLLAR TUBERCULOSIS PULMONAR

PRESENTA

M. EN C. ADRIAN GEOVANNI ROSAS TARACO

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor  
en Ciencias con Orientación en Inmunología

MONTERREY, NUEVO LEON, DICIEMBRE 2006

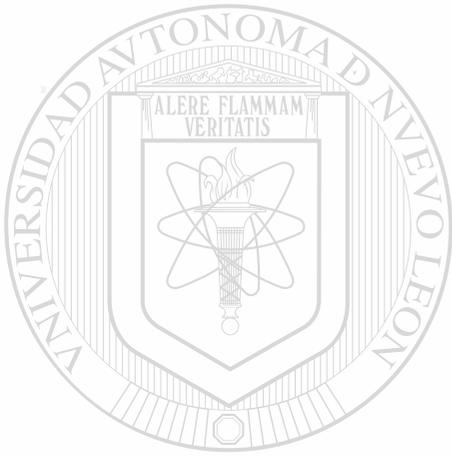
2006  
2006  
FM  
2006  
Z6658  
FD  
. R672

ASOCIACION DEL PATRON Y POLIMORFISMOS DE  
CD11C, CD14 Y TLR4 CON LA SUSCEPTIBILIDAD A  
DESARROLLAR TUBERCULOSIS PULMONAR

AGRI



1020154714



# UANL

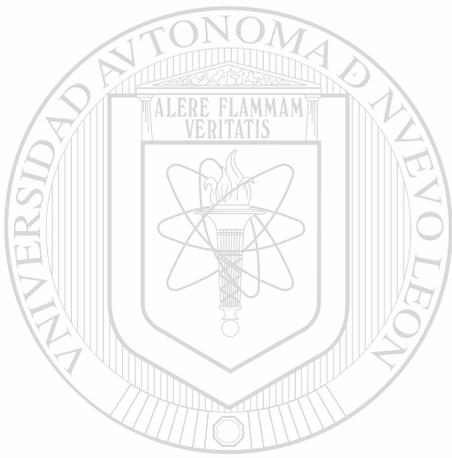
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO DE LA TESIS  
**UANL**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
ASOCIACIÓN DEL PATRON Y POLIMORFISMOS DE  
CD11c, CD14 Y TLR4 CON LA SUSCEPTIBILIDAD A  
DESARROLLAR TUBERCULOSIS PULMONAR  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTA

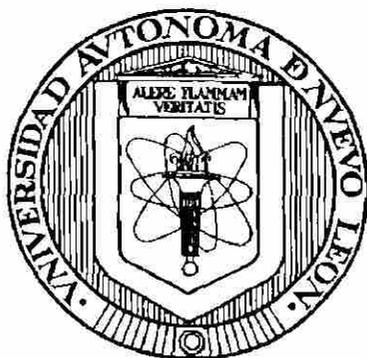
M. EN C. ADRIAN GEOVANNI ROSAS TARACO

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor  
en Ciencias con Orientación en Inmunología

MONTERREY, NUEVO LEÓN, DICIEMBRE 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**Facultad de Medicina**



**Título de la Tesis**

**Asociación del patrón y polimorfismos de CD11c, CD14 y TLR4**

**con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Presenta**

**M. en C. Adrián Geovanni Rosas Taraco**

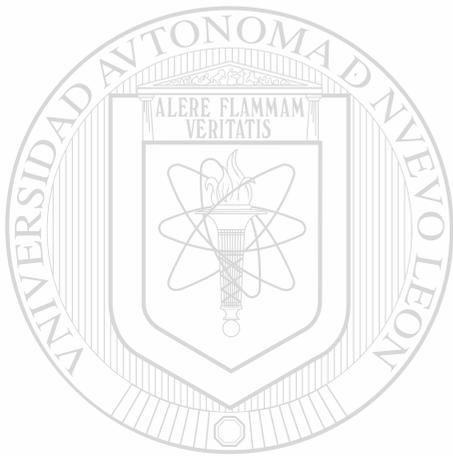
Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con

Orientación en Inmunología

**Monterrey, Nuevo León. Diciembre 2006**

02058

TD  
Z6658  
FM  
2006  
.K672



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Asociación del patrón y polimorfismo de CD11c, CD14 y TLR4  
con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar**

**Aprobación de la Tesis.**



---

**DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA**  
Director de Tesis



---

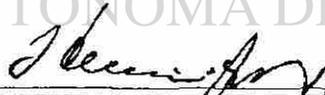
**DRA. AGNES REVOL**

Co-Director



---

**DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA**  
Co-Director



---

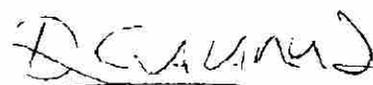
**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

COMISIÓN DE TESIS



---

**DR. LUCIO VERA CABRERA**  
COMISIÓN DE TESIS



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología, Laboratorio de Inmunoinfectología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y la Co-dirección de la Dra. Agnès Revol y del Dr. Mario César Salinas Carmona. Se contó con la Colaboración del Dr. Guillermo Caballero Olín del Instituto Mexicano del Seguro Social UMF No. 28 y el Dr. Adrián Rendón Pérez del CIPTIR (Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias) del Hospital Universitario.

Este Trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la UANL Proyecto No. SA1168-05.

## **Dedicatoria**

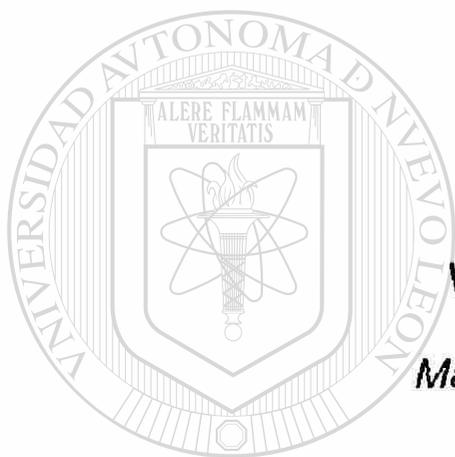
*A Dios*

*A mi Familia:*

*Viviana L. Mata Tijerina*

*María Elena Taraco Reyes*

*Sergio y Alex*



---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## Agradecimiento

**Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza**, por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas, su confianza y especialmente por brindarme la libertad en las tomas de decisiones.

**Dr. Mario César Salinas Carmona**, por abrirme las puertas del Departamento, por compartir sus conocimientos y consejos para la realización de este trabajo.

**Dra. Agnès Revol**, por su tiempo, consejos, enseñanzas y críticas positivas para este trabajo.

**Dra. Herminia Martínez Rodríguez, Dr. Lucio Vera Cabrera y al Dr. Juan Manuel Solís Soto**, por su tiempo, consejos y críticas positivas para este trabajo.

---

**Dr. Luis Adrián Rendón Pérez, Dr. Guillermo Caballero Olín y Lic Enf.**

**Susana Covarrubias**, por su ayuda y colaboración para la realización de este proyecto de investigación.

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**  
**CONACYT**, por la beca otorgada para la realización del postgrado.

**PAICYT, UANL**. Por el financiamiento otorgado para este proyecto con clave No.SA1168-05.

**Compañeros de Postgrado**, por todo el apoyo y sus palabras de aliento.

**Departamento de Inmunología**, a cada uno de ellos por su afecto y apoyo durante mi estancia.

## INDICE

Capítulo	Página
LUGAR DE TRABAJO.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XV
<hr/>	
ABSTRACT.....	XVI
I ANTECEDENTES.....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar.....	4
1.3 Mecanismos de defensa local y mecanismo de entrada del bacilo a su célula huésped.....	7
1.4 Biomarcadores de Susceptibilidad.....	8
1.5 Características de las moléculas y genes analizados en el trabajo.....	11
1.5.1 Receptor de complemento tipo 4 (CD11c o CR4).....	11
1.5.2 Receptor de alta afinidad de LPS (CD14).....	13
1.5.3 Receptor parecido a Toll tipo 4 (TLR4).....	16
II JUSTIFICACIÓN.....	19
III HIPÓTESIS.....	20

IV	OBJETIVO GENERAL.....	21
V	OBJETIVO ESPECIFICOS.....	22
VI	ESTRATEGIA GENERAL.....	23
VII	METODOLOGÍA.....	24
	7.1 Sujetos de estudio y criterios de selección.....	24
	7.2. ELISA detección anticuerpos IgM e IgG anti-proteínas extracelulares <i>M. tuberculosis</i> y cuantificación de CD14 soluble.....	24
	7.3 Análisis de la expresión de CD11c, CD14 y TLR4.....	25
	7.4 Extracción de ADN.....	26
	7.5 Estandarización de las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	27
	7.6 Condiciones de amplificación.....	28
	7.7 Polimorfismos del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP).....	30
	7.8 Análisis de Resultados.....	31
VIII	RESULTADOS.....	32
	8.1 Muestras para el estudio.....	32
	8.2 Características de la población.....	32
	8.3 Expresión de CD11c, CD14 y TLR4 en monocitos de cada uno de los sujetos de estudio.....	36
	8.3.1 Expresión de CD11c en monocitos.....	36
	8.3.2 Expresión de CD14 en monocitos.....	40
	8.3.3 Expresión de TLR4 en monocitos.....	43
	8.4 Cuantificación de CD14s en sueros.....	46
	8.4.1 Curva de Calibración.....	46
	8.4.2 Niveles de CD14s en suero.....	47
	8.5 Comparación de los niveles de CD11c, CD14m/CD14s y TLR4 en contactos IgM positivos y negativos.....	50
	8.6 Amplificación de los productos de los genes <i>cd11c</i> , <i>cd14</i> y <i>tlr4</i> .....	52
	8.6.1 Amplificación del exón 2 del gen <i>cd11c</i> .....	52
	8.6.2 Amplificación del promotor del gen <i>cd14</i> .....	53
	8.6.3 Amplificación del exón 4 del gen <i>tlr4</i> .....	54
	8.7 Análisis de Polimorfismos del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP).....	55

8.7.1 Detección del SNP en el exón 2 del gen <i>cd11c</i> /T→C.....	55
8.7.2 Detección del SNP en el promotor del gen <i>cd14</i> /-159 C→T.....	56
8.7.3 Detección del SNP en el exón 4 del gen <i>tlr4</i> /Asp299Gly A→G.....	57
8.8 Asociación de los genotipos del polimorfismo del promotor de CD14/-159 con los niveles de CD14m/CD14s.....	58
8.9 Análisis de frecuencias alélicas y genotipos.....	61
8.9.1 Frecuencias de genotipos y alelos del SNP en CD11c/exón 2 T→C.....	61
8.9.2 Frecuencias de genotipos y alelos del SNP en el promotor CD14/-159.....	63
8.9.3 Frecuencias de genotipos y alelos del SNP en TLR4/Asp299Gly A→G.....	65
IX DISCUSION.....	67
X CONCLUSIONES.....	73
XI PERSPECTIVAS.....	75
XII LITERATURA CITADA.....	76
ANEXO I.....	92

---

ANEXO II.....	95
---------------	----

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

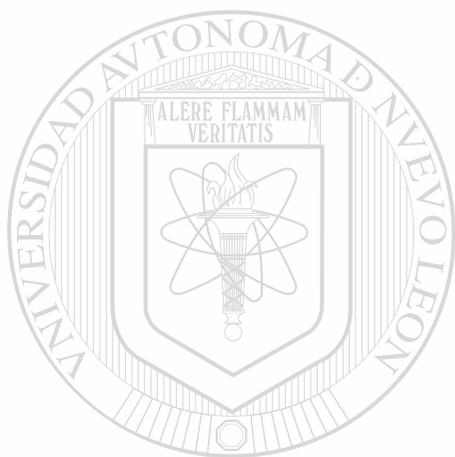
## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Estimación global de la incidencia y mortalidad de la tuberculosis en 1990.....	2
Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificar los genes estudiados y sus secuencias.....	25
Tabla 3. Condiciones de PCR para los polimorfismos estudiados.....	26
Tabla 4. Programa inicial de amplificación para los polimorfismos.....	26
Tabla 5. Reacciones de digestión para la detección de los polimorfismos.....	27
Tabla 6. Frecuencias de genotipos y alelos en CD11c/exón 2 T→C en controles, pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.....	59
Tabla 7. Frecuencias de genotipos y alelos en CD14/-159 C→T en controles, pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.....	61
Tabla 8. Frecuencias de genotipos y alelos en TLR4/Asp299Gly A→G en controles, pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Respuesta Inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
2. Receptores que reconocen patrones moleculares de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y sus componentes.....	10
3. Detección de anticuerpos IgM anti-proteínas del filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar, contactos y sujetos sanos.....	31
4. Detección de anticuerpos IgG anti-proteínas del filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar, contactos y sujetos sanos.....	32
5. Selección de la población para analizar la expresión de CD11c, CD14 y TLR4.	33
6. Niveles de expresión de CD11c en monocitos de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar a los 0 y 6-7 meses de tratamiento, así como, de los contactos de los pacientes.	35
7. Niveles de expresión de CD11c en monocitos de los 24 pacientes antes y 6-7 meses después de tratamiento.	36
8. Niveles de expresión de CD14 en monocitos de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar a los 0 y 6-7 meses de tratamiento, así como, de los contactos de los pacientes.	38
9. Niveles de expresión de CD14 en monocitos de los 24 pacientes antes y 6-7 meses después de tratamiento.	39
10. Niveles de expresión de TLR4 en monocitos de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar a los 0 y 6-7 meses de tratamiento, así como, de los contactos de los pacientes.	41
11. Niveles de expresión de TLR4 en monocitos de los 24 pacientes antes y 6-7 meses después de tratamiento.	42
12. Curva de calibración de CD14s empleando estándares de concentración conocida en el rango de 0 a 112 ng/ml.	43
13. Niveles de expresión de CD14s en monocitos de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar a los 0 y 6-7 meses después de tratamiento, así como, de los contactos de los pacientes.	45
14. Niveles de expresión de CD14s en monocitos de los 24 pacientes antes y 6-7 meses después de tratamiento.	46
15. Comparación de los niveles de CD11c, CD14m/CD14s y TLR4 en contactos IgM positivos versus contactos IgM negativos.	48
16. Amplificación del exón 2 del gen <i>cd11c</i>	49
17. Amplificación de la región promotora del gen <i>cd14</i>	50
18. Amplificación del exón 4 del gen <i>tlr4</i>	51

19. Análisis de RFLP para la detección del SNP en el exón 2 del gen <i>cd11c/T→C</i>	52
20. Análisis de RFLP para la detección del SNP en la región promotora del gen <i>cd14/-159 C→T</i>	53
21. Análisis de RFLP para la detección del SNP TLR4/Asp299Gly	54
22. Asociación del genotipo del polimorfismo en el promotor de CD14 con los niveles de CD14 de membrana.	56
23. Asociación del genotipo del polimorfismo en el promotor de CD14 con los niveles de CD14 soluble.	57



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ABREVIATURAS

CD	Grupos de diferenciación, del inglés Cluster Differentiation
TLR	Receptores similares a Toll, del inglés Toll like receptors
MDR	Multidrogo-resistencia
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida
µm	Micrómetro
%	Por ciento
IL	Interleucina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa, del inglés Tumor necrosis factor-alpha
Th	Linfocito T cooperador, del inglés T helper lymphocyte
IFN-γ	Interferón-gamma
CMN	Células mononucleares
PPD	Derivado purificado proteico, del inglés Purified Protein Derivative
SP	Proteína surfactante, del inglés Surfactant protein
IRNs	Intermediarios reactivos de nitrógeno
RRP	Receptores que reconocen patrones
Fc	Fracción cristalizante de inmunoglobulinas
LAM	Lipoarabinomanana
kDa	Kilodaltones
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LPS	Lipopolisacárido
HLA	Antígeno leucocitario humano, del inglés human leucocyte antigen
NRAMP1	Proteína-1 de macrófago asociada a resistencia natural, del inglés natural resistance associated macrophage protein-1
VDR	Receptor de vitamina D, del inglés vitamin D receptor
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
CR	Receptor de complemento, del inglés complement receptor
NK	Célula asesina natural, del inglés natural killer
C3b	Porción b del componente de complemento 3
C2a	Porción a del componente de complemento 2
CHO	Células de ovario de hámster chino, del inglés Chinese Hamster Ovary cells
ADNc	ADN complementario
Kb	Kilobases
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
C	Citosina
A	Adenina
T	Timina
G	Guanina
PMN	Polimorfonucleares
NF-κB	Factor nuclear-κB, del inglés nuclear factor-κB
MMP	Metaloproteinasa

CD14s	CD14 soluble
Acm	Anticuerpos monoclonales
AraLAM	Arabinosa del LAM
ManLAM	Manosa del LAM
PCEB	Pared celular de <i>Streptococo</i> del grupo B
HSP	Proteínas de choque térmico, del inglés Heat Shock Proteins
LBP	Proteína de unión a LPS, del inglés LPS Binding Protein
Asp	Aspartato
Gly	Glicina
Thr	Treonina
Ile	Isoleucina
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
MI	Mililitro
FITC	Isotiocianato de guanidina, del inglés Fluorescein isothiocyanate
PE	Ficoeretrina, del inglés Phycoerythryne
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
TSNT	Tritón-SDS-Cloruro de Sodio-Tris
SDS	Dodecil sulfato de sodio
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
$\mu$	Microlitro
pH	Potencial de Hidrógeno
mM	Milimolar
TE	Amortiguador Tris-EDTA
Rpm	Revoluciones por minuto
Min	Minutos
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
M	Molar
V	Volumen
H	Hora
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase chain reaction
Pb	Pares de bases
$\mu$ M	Micromolar
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatos
NaCl	Cloruro de sodio
Ng	Nanogramos
U	Unidad de enzima
Seg	Segundos
RFLP	Polimorfismos de tamaño de fragmentos de restricción
ASB	Albúmina Sérica Bovina
V	Volts
Cm	Centímetros
P	Probabilidad
UMF	Unidad de Medicina Familiar

## RESUMEN

Adrián Geovanni Rosas Taraco  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio: Asociación del patrón y polimorfismos de CD11c, CD14 y TLR4 con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar

Número de páginas: 99

Candidato al grado de Doctor en Ciencias  
con Orientación en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología

**Propósito y método del estudio:** La tuberculosis sigue siendo un problema de salud mundial, la cual es causada por *Mycobacterium tuberculosis*. La búsqueda de biomarcadores de susceptibilidad y resistencia a desarrollar tuberculosis ha sido muy exhaustiva y enfocada principalmente a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. En los últimos años, diversos reportes describen la existencia de receptores que reconocen patrones moleculares de patógenos. En el caso de *Mycobacterium tuberculosis* se han identificado diversos receptores que reconocen patrones moleculares del bacilo o sus componentes, entre ellos se encuentran el receptor de complemento tipo 4 (CD11c), CD14 y TLR4, los cuales juegan un papel importante en la inducción de señales intracelulares que activan factores de transcripción involucrados en la regulación de citocinas necesarias para la activación de la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar si CD11c, CD14 y TLR4 eran biomarcadores de susceptibilidad o resistencia a desarrollar tuberculosis pulmonar. En este trabajo se analizaron muestras de 114 sujetos sanos (controles), 104 pacientes con tuberculosis pulmonar y 67 contactos intra-domiciliarios de los pacientes. A todas las muestras se les analizó los niveles de expresión de CD11c, CD14 y TLR4 por citometría de flujo, mientras que la detección de anticuerpos específicos de antígenos de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, así como la cuantificación de CD14 soluble se realizaron empleando el método de ELISA. Las frecuencias de los polimorfismos en CD11c/exón 2 T→C, CD14-159 C→T y TLR4/Asp299Gly fueron detectadas empleando el método de PCR-RFLP.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los niveles de CD11c, CD14 membrana / CD14 soluble y TLR4se encontraron elevados en los pacientes con tuberculosis pulmonar antes de iniciar el tratamiento en comparación con los controles ( $P < 0.05$ ), los cuales disminuyeron significativamente a valores similares a los controles después de 6-7 meses de tratamiento ( $P > 0.05$ ). Por otro lado, los contactos de los pacientes también presentaron altos niveles de las moléculas estudiadas. Las frecuencias de los polimorfismos en CD11c/exón 2 T→C y TLR4/Asp299Gly fueron muy similares en los diferentes grupos de estudio (90-96%, en ambos polimorfismos). Las frecuencias CD14-159 TT fueron altas en los pacientes con tuberculosis pulmonar y se presentaron en el 50% de los contactos que desarrollaron tuberculosis. No se encontró diferencia significativa en los análisis de asociación de genotipos de CD14-159 y los niveles de CD14 de membrana y soluble. **Conclusiones:** Los hallazgos encontrados con CD11c, CD14m/CD14s y TLR4 sugieren que dichas moléculas pudieran servir como biomarcadores de pronóstico en la tuberculosis pulmonar. Los SNP en los genes de CD11c y TLR4 no se encuentran asociados con el riesgo o la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar. Por otro lado, el SNP en el promotor de CD14-159 T se encuentra asociado como un factor de riesgo para desarrollar tuberculosis pulmonar. Finalmente, no existe asociación entre los genotipos del promotor de CD14-159 y los niveles de CD14m/CD14s.

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza  
Director de Tesis

## ABSTRACT

Adrián Geovanni Rosas Taraco  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Title: Association of CD11c, CD14 and TLR4 with susceptibility to pulmonary tuberculosis.  
Number of pages: 99

Candidate to Doctor in Science Degree  
with Immunology Specialty

Area: Immunology

**Aim and methods:** The aim of this study was to determine the relationship between CD11c, CD14 or TLR4 gene with the development of pulmonary tuberculosis. Analysis of expression of CD11c, CD14 and TLR4 were done using flow cytometry. Genotypes/alleles frequencies in CD11c/exon 2 T→C, CD14/-159 and TLR4/Asp299Gly were obtained from 104 pulmonary tuberculosis patients, 67 household contacts, and 114 healthy subjects (both PPD positive and negative). PCR amplification of a DNA fragment containing the SNP was performed, and analyzed by electrophoresis after digestions with *NciI* (for CD11c/exon 2), *AvaII* (for CD14 promoter) or *NcoI* (for TLR4/Asp299Gly). Serum sCD14 levels were quantified by ELISA.

**Contributions and Conclusions:** We observed high levels of mCD14 and sCD14 in tuberculous patients and household contacts ( $P < 0.05$ ). However, the levels decreased after therapy tuberculosis patients resolved the infection ( $P > 0.05$ ). A similar effect was observed with mTLR4 and CD11c. The frequency of the CD14/-159TT genotype was higher in the pulmonary tuberculosis patients compared to healthy subjects (35.6 vs 12.3%). Patients who were homozygous for allele T of promoter of CD14 gene had a significantly higher risk for developing pulmonary tuberculosis with an odds ratio of 2.267 (95% CI 1.5-3.3). This allele was also found in 50% of the household contacts who developed tuberculosis. sCD14 or mCD14 levels in pulmonary tuberculosis patients were not associated with the CD14/-159TT genotype ( $p > 0.05$ ). Non association was found between TLR4/Asp299Gly and pulmonary tuberculosis.

**Conclusions:** CD14/-159TT might be a risk factor for development of pulmonary tuberculosis, while mCD14/sCD14 and mTLR4 are possible prognosis biomarkers for tuberculosis disease.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza  
Director de Tesis

## CAPITULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Generalidades

La tuberculosis (TB) es una enfermedad multifactorial y es considerada como un problema de salud mundial debido a su alta prevalencia e índices de morbi-mortalidad. En los años 60, la TB se creía controlada sin embargo, desde entonces, se ha observado una reemergencia de la enfermedad debido a diversos factores como la aparición y expansión de cepas multidrogo-resistentes (MDR) y del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros. Se ha estimado que en los 90's aproximadamente 2,000 millones de personas (una tercera parte de la población mundial) se encontraban infectados con *M. tuberculosis* y el número de nuevos casos fue de más de 7.5 millones alrededor del mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1989 se reportaron 1.3 millones de casos y 450 000 muertos por TB en países desarrollados presentándose con mayor frecuencia en los jóvenes.<sup>1</sup> En América Latina se presentan entre 250-300 mil nuevos casos y 20-25 mil muertes por año, lo anterior coloca a esta región en el tercer lugar de incidencia por debajo de África y Asia, siendo Brasil, México y Perú los países que presentan mayor incidencia (Tabla 1).<sup>1,2</sup>

**Tabla1.** Estimación global de la incidencia y mortalidad de TB en 1990<sup>1</sup>.

	Incidencia de TB		Mortalidad de TB	
	Casos	Proporción*	Casos	Proporción*
<b>Sudeste de Asia</b>	3 106 000	237	1 087 000	84
<b>Oeste del Pacífico **</b>	1 839 000	136	644 000	48
<b>África</b>	992 000	191	393 000	76
<b>Este del Mediterráneo</b>	641 000	165	249 000	64
<b>América ***</b>	569 000	127	114 000	25
<b>Este de Europa</b>	194 000	47	29 000	7
<b>Países Industrializados<math>\Psi</math></b>	196 000	23	14 000	2
<b>Total</b>	<b>7 537 000</b>	<b>143</b>	<b>2 530 000</b>	<b>48</b>

\*Proporción de Incidencia y Mortalidad por cada 100 000 individuos de población.

\*\*Todos los países de la región excepto Australia, Japón y Nueva Zelanda.

\*\*\*Todos los países de la región excepto Canadá y Estados Unidos.

$\Psi$ Europa del Este más Australia, Canadá, Japón, Nueva Zelanda y Estados Unidos.

La infección inicia con la entrada del bacilo de la TB en el cuerpo, la bacteria ingresa a través del tracto respiratorio al inhalar núcleos de saliva que contienen micobacterias, las cuales alcanzan un tamaño entre 1–2  $\mu\text{m}$  o menos. La enfermedad depende del establecimiento y de la proliferación de bacilos virulentos y de la propia respuesta del huésped. Una vez la bacteria en el pulmón, pueden desencadenarse cuatro escenarios: 1) una respuesta inicial del hospedero que permite matar a todos los bacilos efectivamente, por lo tanto la persona no desarrolla TB; 2) el microorganismo comienza a multiplicarse inmediatamente después de la infección, causando una TB primaria; 3) el bacilo llega y se establece pero no causa enfermedad, alcanzando un “equilibrio” con el huésped; tales pacientes tienen una enfermedad latente; finalmente 4) estos microorganismos latentes pueden eventualmente crecer y causar la enfermedad de TB reactiva cuando se rompe ese equilibrio.<sup>3</sup>

Los individuos con una TB activa pueden contagiar con mayor probabilidad a las personas con las que conviven habitualmente (familiares cercanos, amigos y compañeros de trabajo) por lo que se recomienda que una vez identificado un individuo como portador de una TB activa, todas las personas cercanas a él se realicen las pruebas pertinentes para establecer su condición infecciosa.<sup>2</sup> Un paciente bacilífero puede infectar al 30% de las personas que mantienen un contacto cercano con el, de los cuales solo del 5-15% de las personas infectadas desarrollarán una TB activa que sin tratamiento puede seguir su curso, prolongarse y causar la muerte en 2-3 años.<sup>4-5</sup>

## 1.2 Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar

El estado inmunológico del huésped es fundamental en la interacción huésped-parásito y determina el futuro de ambos. La micobacteria al igual que otras bacterias intracelulares facultativas, tiene la capacidad de utilizar las células fagocíticas para multiplicarse. La interacción de las micobacterias con el macrófago inicia con la unión de la bacteria (o de sus componentes) a moléculas expresadas en la superficie celular del macrófago, lo cual induce la internalización y/o a la inducción de la producción de citocinas. Las citocinas proinflamatorias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) se producen en las etapas iniciales de la infección, atraen los neutrófilos, linfocitos y macrófagos para que

---

fagociten los bacilos extracelulares, y además generan un foco inflamatorio. Posteriormente, los linfocitos T CD4 específicos se transforman en linfocitos

Th1 bajo la influencia de IL-12 secretada por los macrófagos. Estos linfocitos tras su activación secretan otras citocinas, principalmente interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual activará los macrófagos infectados, inducirá la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno y favorecerá la eliminación de la bacteria. Sin embargo, mientras se desencadena esta respuesta inmune innata, los bacilos se van diseminando hacia los nódulos linfáticos regionales y los vasos sanguíneos. Se ha atribuido un papel importante en la resolución de la infección a las citocinas de Th1, mientras que las de células T cooperadoras tipo 2 (Th2)

como la interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) no se han asociado con la resolución de la infección (Figura 1).<sup>6-8</sup>

La orientación hacia una respuesta inmune tipo TH1 o TH2, parece estar relacionada, con la naturaleza del ligando bacteriano y/o por la vía del receptor de entrada a la célula fagocítica. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio estimulando células mononucleares (CMN) de individuos PPD (-) con dosis bajas y altas de *M. tuberculosis* H37Rv y sus fracciones, demostraron que las proteínas intracelulares son excelentes inductoras de TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que los polisacáridos inducen una respuesta de Th2, representada por IL-10.<sup>9</sup>

En nuestro laboratorio hemos encontrado altas concentraciones de IL-8 en lavado broncoalveolar y la expresión del gen que codifica para TNF- $\alpha$  en células de lavado broncoalveolar de sujetos con tuberculosis pulmonar activa.<sup>10</sup>

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 1. Respuesta Inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>6-7,20,23</sup>

### 1.3 Mecanismos de defensa local y mecanismo de entrada del bacilo a su célula huésped.

El moco de la vías aéreas superiores es la primera línea de defensa con la que se enfrenta la micobacteria, ya que el moco contiene diversos efectores solubles como la lisozima, lactoferrina, defensinas y catelicidinas. La lisozima digiere rápidamente la micobacteria en estudios *in vitro*.<sup>11</sup> La lactoferrina secuestra el hierro del microambiente extracelular necesario para favorecer la infección de macrófagos por el bacilo.<sup>12,13</sup> Las alfa defensinas tienen actividad micobactericida *in vitro*.<sup>14</sup> Los efectores solubles surfactantes en las vías respiratorias bajas con los que se puede encontrar la micobacteria son principalmente las proteínas surfactantes A (SP-A) y D (SP-D) que opsonizan al

bacilo. La opsonización de *Mycobacterium tuberculosis* por SP-A induce la fagocitosis por macrófagos, mientras que SP-D la reduce. SP-A induce la expresión de CD206 (receptor de manosa) en macrófagos, pero regula negativamente la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno (IRNs), con un beneficio para el patógeno.<sup>15-17</sup> Los anticuerpos específicos pueden ser producidos contra *Mycobacterium tuberculosis* por células B tipo 1 y 2 respectivamente. Los anticuerpos presentes en el moco opsonizan al bacilo e incrementan su fagocitosis por macrófagos vía receptores Fc. El componente C3b de complemento es liberado por las células alveolares tipo II, así como por macrófagos alveolares, los cuales contribuyen a la opsonización y fagocitosis de la micobacteria.<sup>18-19</sup>

Una vez que la micobacteria pasa a vías respiratorias bajas ya sea opsonizada o no, se encuentra con las células epiteliales y los macrófagos alveolares. El reconocimiento del patógeno se da a través de receptores que reconocen patrones (RRP) tales como receptores de desecho, receptores de manosa, CD14, CD44, DC-SIGN y receptores para opsoninas (receptores para proteínas surfactantes, receptores Fc y receptores de complemento).<sup>20-23</sup> El reconocimiento de lipoarabinoamano (LAM) y la lipoproteína secretoria de 19 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* es mediada por receptores parecidos a Toll (TLR) tipo 2 y 6 (TLR2 y TLR6) expresados en la membrana de macrófagos alveolares. Componentes del sobrenadante de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* son reconocidos por TLR4, mientras que el ADN micobacteriano por TLR9. ( Figura 2).<sup>24-26</sup>

---

#### 1.4 Biomarcadores de Susceptibilidad

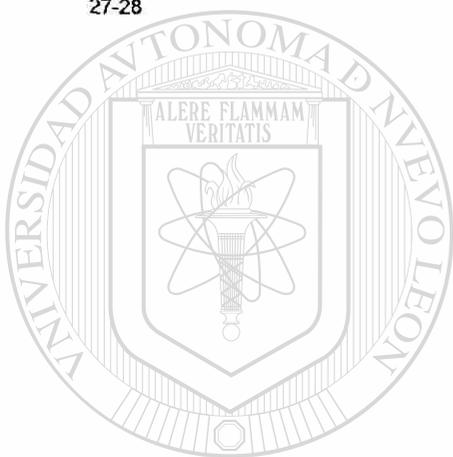
La genética, el medio ambiente y la evolución misma juegan un papel importante en la resistencia o susceptibilidad a una gran variedad de enfermedades bacteriana, virales, parasitarias u hongos.

En la tuberculosis, similar a lo que ha sucedido para otras enfermedades, se han llevado a cabo estudios para conocer la existencia de moléculas o mutaciones genéticas asociadas con el desarrollo de la enfermedad. Diferentes genes del hospedero son candidatos para ser asociados con la susceptibilidad

*Asociación del patrón y polimorfismos de CD11c, CD14 y TLR4 con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar*

a desarrollar tuberculosis, como ejemplo de ello tenemos aquellos encontrados en HLA-DQB1, HLA-DR2, el receptor de la vitamina D, Proteína 1 de macrófago asociada con la resistencia natural (*NRAMP1*), TNF- $\alpha$ , Proteínas de unión a manosa, receptor de interferón-gamma, interleucina 10, interleucina 1 $\alpha$  y 1 $\beta$ , receptor de complemento 1, ICAM 1, fucosiltransferasa 2, oxido nítrico sintasa inducible, receptores de quimiocinas, interleucina 4, interleucina 6, entre otros.

27-28



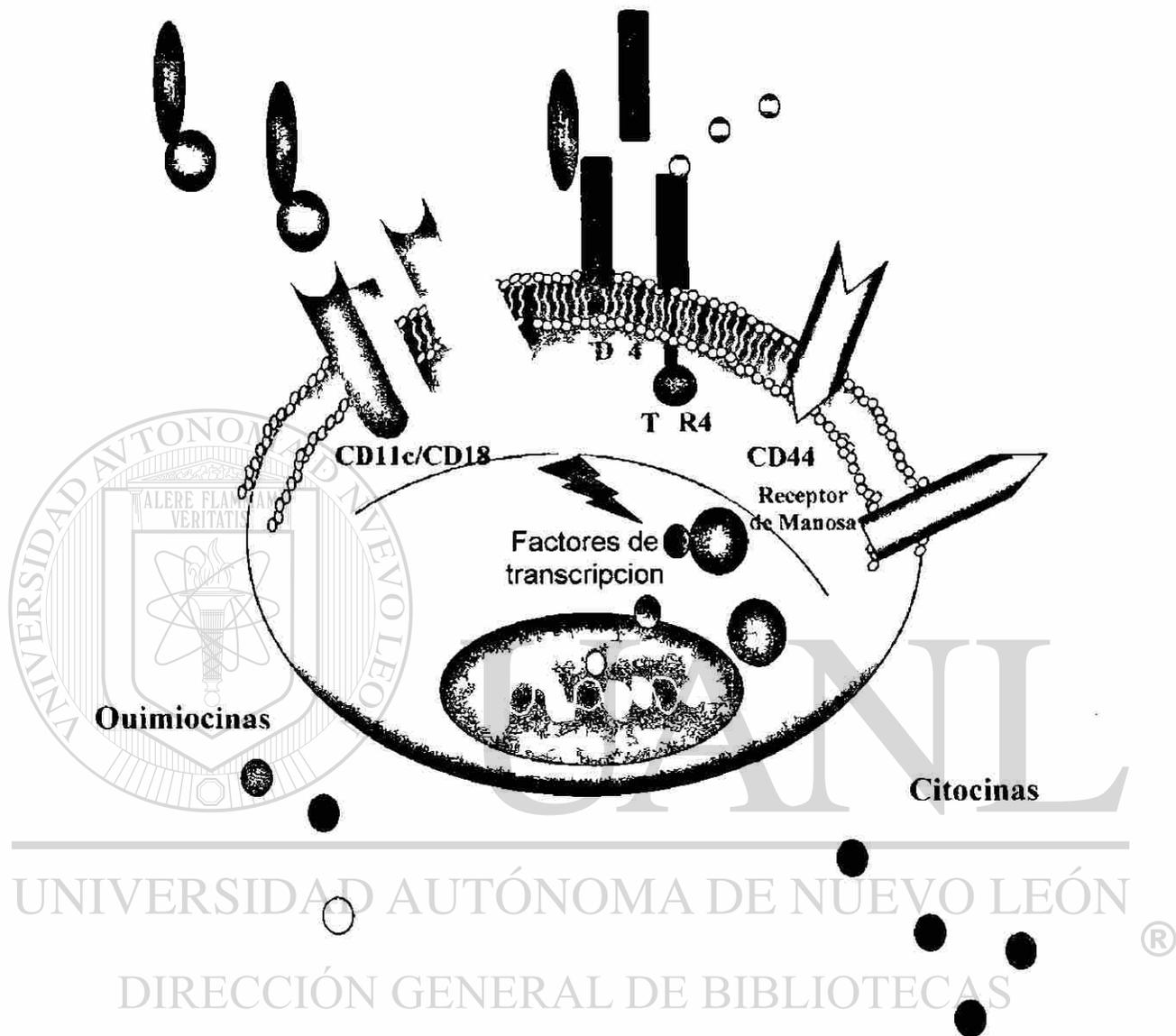
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 2.** Receptores que reconocen patrones moleculares de *Mycobacterium tuberculosis* o sus componentes. Se muestran los principales receptores celulares empleados por *Mycobacterium tuberculosis* para internalizarse a la célula huésped. Una vez reconocida el bacilo se inducen señales intracelulares activadores de factores de transcripción que median la producción de citocinas y quimiocinas involucradas en la respuesta inmune contra la micobacteria.

## 1.5 Características de las moléculas y genes analizados en el trabajo

### 1.5.1 Receptor de complemento tipo 4 (CD11c o CR4)

El receptor de complemento tipo 4 (CD11c) es una glicoproteína de adhesión de 150-kDa (forma la cadena alfa de la integrina p150), la cual se expresa sobre la superficie celular de diferentes tipos de células como: células asesinas naturales (NK), ciertos subgrupos de linfocitos T y B, monocitos, granulocitos y macrófagos. CD11c se encuentra asociada con CD18 y ambas moléculas forman el complejo CD11c/CD18, dicho complejo participa en la unión de fibrinógeno y se ha reportado que es uno de los receptores para iC3b e ICAM-

1. 29-31

---

En la superficie del macrófago se expresan receptores del complemento que participan en la respuesta inmune primaria contra los microorganismos.

Estudios indican que las micobacterias patógenas como *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. avium* emplean los receptores de complemento para internalizarse a su célula blanco, este mecanismo depende de la asociación de la micobacteria con el componente C2a del complemento. El complejo C2a-micobacteria escinde al componente C3 del complemento, lo cual resulta en la opsonización de la bacteria por C3b y su reconocimiento por el macrófago.<sup>22</sup> Sin embargo, existen también evidencias de que la unión a CD11c de *M. tuberculosis*, puede ser de manera no opsónica, esto fue demostrado adicionando anticuerpos monoclonales anti-CD11c y observando un bloqueo en la unión de la bacteria a

macrófagos derivados de monocitos. Lo anterior fue corroborado por experimentos de transfección de células de ovario de hámster chino (CHO) con ADNc de CR4, las células transfectadas adquirieron la capacidad de expresar en su superficie el receptor CR4 permitiendo la unión de *M. tuberculosis*. Finalmente, se ha reportado que la unión de *M. tuberculosis* a CR4 desencadena una potente señal de traducción, que resulta en la fosforilación por una tirosina proteína cinasa, de proteínas mayores de 60 kDa del macrófago, las cuales están involucradas en el proceso fagocítico.<sup>32</sup>

En nuestro laboratorio se observó una disminución de CD11c a la superficie de los monocitos de los pacientes con TB multidrogoresistente, indicando que su expresión podría ser regulada negativamente por proteínas intracelulares, lípidos y polisacáridos de *M. tuberculosis* H37Rv.<sup>33-34</sup>

El gen de CD11c humano se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 16 y mide aproximadamente 27.8 kb.<sup>35</sup> La expresión del gen de CD11c es regulada por los factores de transcripción SP1 en conjunto con AP1, así como también puede ser regulado por SP3, los cuales tiene sitios de unión en el promotor de CD11c.<sup>36-37</sup> Actualmente han sido reportados 26 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados a lo largo del gen de CD11c, pero solo unos pocos se han relacionado con ciertas enfermedades.<sup>38</sup> SNPs localizados en la posición +44 G/A del exón 9 y en la posición +50 C/G del exón 15, los cuales han sido correlacionados con la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.<sup>35</sup> Hellming y col. en el 2005, reportaron una asociación entre

un SNP encontrado en el exón 15 y otro en el intrón 31 de CD11c con la úlcera gástrica.<sup>39</sup>

### 1.5.2 Receptor de alta afinidad de LPS (CD14)

El receptor CD14 es una proteína de membrana de 55 kDa anclada a glucosil-fosfatidilinositol expresada sobre la superficie de monocitos, macrófagos, células de la microglía y leucocitos PMN.<sup>40-41</sup> CD14 es reconocido como el principal receptor de lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas.<sup>42-44</sup>

Una vez que interaccionan CD14-LPS, el receptor similar a toll tipo 4 (TLR4) actúa como un coreceptor e induce señales intracelulares conduciendo a la activación de factores nucleares como NF- $\kappa$ B. Lo anterior desencadena la síntesis de mediadores solubles inmunológicos como las citocinas y quimiocinas.<sup>45</sup>

CD14 de membrana es escindido enzimáticamente por la fosfolipasa C, fosfolipasa D, proteasas o por la metaloproteínasa tipo-12 (MMP-12) para dar lugar a la formación de CD14 soluble (CD14s).<sup>46-49</sup> El CD14s es producido principalmente en los hepatocitos y ha sido considerado por algunos autores como una proteína de fase aguda.<sup>50-51</sup> Los niveles de CD14s se han encontrado altos en diversas enfermedades infecciosas, como no infecciosas tales como: choque séptico, enfermedad de Kawasaki, dermatitis atópica,

enfermedad del hígado, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, brucelosis, tuberculosis, etc.<sup>52-58</sup>

CD14 es un miembro de los receptores que median la fagocitosis de *M. tuberculosis*, a través del reconocimiento de lipoarabinomanana (LAM) y dicha unión induce al macrófago a producir IL-8, la cual es un quimiocina atrayente principalmente de neutrófilos. La participación de CD14 en la unión de las micobacterias a las células de microglía se ha demostrado, ya que al adicionar CD14 soluble o anticuerpos monoclonales (Acm) anti-CD14 a un medio celular de macrófagos impide la unión de la micobacteria al macrófago y con ello la fagocitosis.<sup>59</sup>

Diversos investigadores describieron que tanto el residuo de arabinosa del LAM (AraLAM) como el de manosa (ManLAM) induce una respuesta distinta en los receptores de manosa y CD14 en monocitos humanos y dicha respuesta es dependiente del estado de diferenciación celular.<sup>60-62</sup>

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En 1998, Medvedev reportó que el bloqueo de CD14, CR3 y CR4 inhibe la producción de TNF- $\alpha$  inducida en los monocitos humanos tratados con la pared celular de estreptococo del grupo B (PCEB). Las células CHO transfectadas con CD14 responden al LPS y a PCEB, y ambos antígenos inducen la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B. Esta activación de NF- $\kappa$ B por el LPS se observa también en células CHO transfectadas con CR3 y CR4, sin embargo el PCEB no es capaz de activarlo.<sup>63</sup>

En nuestro laboratorio hemos observado una elevación de la expresión de CD14 en células de pacientes con TB pulmonar y extrapulmonar, así como en pacientes infectados con el VIH. Estos resultados sugieren que la micobacteria puede sobre-regular la expresión de CD14 para mantener sitios de unión e internalización al macrófago y así asegurar su supervivencia. Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que los lípidos y polisacáridos de *M. tuberculosis* H37Rv inducen la expresión de CD14.<sup>33-34</sup>

El gen de CD14 humano se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5, es un gen de 38.9 kb.<sup>64</sup> La expresión del gen de CD14 es regulada por los factores de transcripción SP1 y SP3, los cuales tienen sitios de unión en el promotor de CD14.<sup>65</sup> Actualmente se conocen 31 SNPs

(principalmente los localizados en la región promotora) y muchos de ellos han sido asociados con una variedad de enfermedades.<sup>66</sup> Hubacek y col. en 1999 y Zee y col. en el 2001, reportaron que el SNP localizado en la posición del promotor -260 (C/T) está asociado con el riesgo de infarto a miocardio.<sup>67-68</sup> Por otro lado, existen diversos reportes donde el SNP en la posición -159 de la región promotora del gen de CD14 (T/C) ha sido asociado con incremento en el riesgo de infarto a miocardio, incremento de nefropatía por IgA, incremento de CD14s e IgE total, disminución de IL-4, asociación con los niveles proteína C reactiva, periodontitis crónica, enfermedad de Crohn y susceptibilidad a brucelosis.<sup>69-77</sup>

### 1.5.3 Receptor parecido a Toll tipo 4 (TLR4)

Los receptores toll fueron descubiertos inicialmente en *Drosophila*, en donde están involucrados en la mediación de la polarización dorsoventral en el desarrollo de embriones y en la inmunidad en esta especie. Posteriormente, se identificaron receptores con secuencias homólogas en el humano, por tal similitud fueron denominadas receptores parecidos a toll, del inglés toll-like receptors (TLRs).<sup>78</sup>

El receptor similar a Toll-4 humano es una glicoproteína transmembranal, es expresada constitutivamente en monocitos y células endoteliales.<sup>79</sup> En recientes reportes, TLR4 ha sido identificado como el receptor para lipopolisacárido

(LPS), pero además este puede interactuar con diversas moléculas tales como proteínas de choque térmico (HSP), fibronectina, fibrinógeno, entre otras.<sup>80-81</sup> Se

sabe que las cepas de ratones C3H/HeJ y C57BL10/ScCr su respuesta a los LPS es muy escasa y en ambas cepas se identificaron mutaciones en el gen de TLR4.<sup>82</sup>

El reconocimiento de los LPS mediante TLR4 requiere la participación de otras moléculas tales como la proteína de unión a LPS (LBP) y CD14. El LPS se une a la LBP presente en el suero y posteriormente el complejo es reconocido por el receptor CD14. La estimulación por LPS va seguida de acercamiento físico del receptor CD14 y TLR4. La MD-2, una molécula que se asocia con la porción extracelular

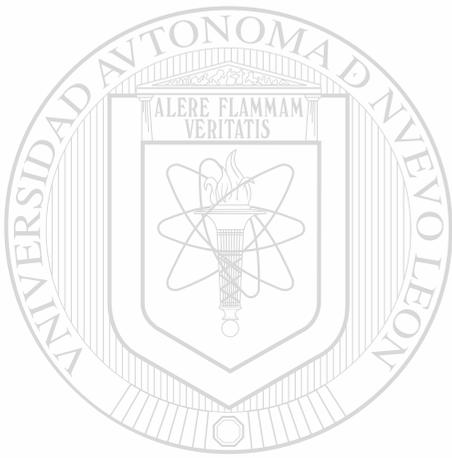
del TLR4, aumenta la respuesta al LPS. La unión de LPS a TLR4 induce la activación de factores de transcripción, principalmente, la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) este a su vez media la expresión de genes de diversas moléculas involucradas con el sistema inmune, entre ellas se encuentran las citocinas proinflamatorias y moléculas co-estimuladoras.<sup>83-84</sup>

El TLR4 ha sido asociado en la activación de la respuesta inmune celular contra *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>85</sup> Bulut y col. en el 2005, reportaron que el TLR4 puede reconocer lipoproteínas secretadas al medio de cultivo de *M. tuberculosis* especialmente la lipoproteína de 19 kDa.<sup>86</sup> Por otra parte, Abel y col. en el 2002, reportaron que TLR4 es necesario para el control de la infección crónica por *M. tuberculosis* en un modelo de ratones.<sup>87</sup>

El gen de TLR4 humano se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 9 y mide aproximadamente 11.46 kb.<sup>88</sup> Se han reportado 97 SNP en este gen de los cuales dos muy comunes han sido relacionados con una variedad de enfermedades: el primero es la sustitución de adenina por guanina en la posición +896, el cual resulta en el reemplazo de un residuo de ácido aspártico (Asp) por glicina en la posición 299 de la proteína (Asp299Gly); mientras que el segundo ocurre un cambio de treonina por isoleucina en la posición 399 de la proteína (Thr399Ile).<sup>88-89</sup>

*Asociación del patrón y polimorfismos de CD11c, CD14 y TLR4 con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar*

El SNP TLR4/Asp299Gly se ha relacionado con hiporrespuesta a endotoxinas, eventos coronarios agudos, incremento en el riesgo a infecciones por Gram-negativos, disminución de la neuropatía diabética, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, susceptibilidad a brucelosis en una población Iraní y susceptibilidad a malaria en una población Africana, entre otros.<sup>82,90-95</sup>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

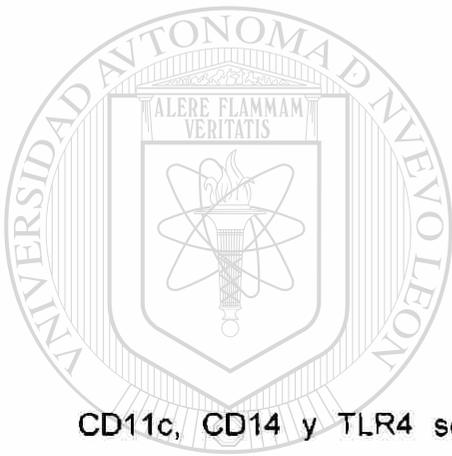
## CAPÍTULO II

### JUSTIFICACIÓN

A la fecha la tuberculosis constituye un problema de salud mundial, una tercera parte de la población se encuentra infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. Factores tales como la infección por VIH, aparición de cepas drogas resistentes, diabetes mellitus, la genética (del hospedero y del microorganismo), hacen que este panorama, sea poco alentador para el control de esta enfermedad. Los receptores empleados por la micobacteria y los TLRs son elementos primordiales de la ruta de entrada de la bacteria e influyen directamente sobre su permanencia en el organismo y desarrollo de la infección. El perfil de estos receptores expresados en la superficie celular cambia (tipo y cantidad) en un

---

individuo en respuesta a las condiciones fisiológicas y/o patológicas, pero también puede variar entre individuos, de acuerdo a los polimorfismos que presentan. A la fecha, no existe estudio que correlacione el perfil y los polimorfismos de los receptores celulares para *M. tuberculosis* con la susceptibilidad a la infección. La identificación de algunos de los factores de susceptibilidad (perfil de receptores y polimorfismos) facilitarán la detección de los individuos susceptibles a desarrollar tuberculosis pulmonar, dentro de un grupo de personas que presentan mayor riesgo de ser infectadas (los contactos directos de los pacientes con TB).



## **CAPITULO III**

### **HIPOTESIS**

CD11c, CD14 y TLR4 son marcadores que predicen la susceptibilidad a

---

desarrollar tuberculosis pulmonar tanto en pacientes como en sus contactos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

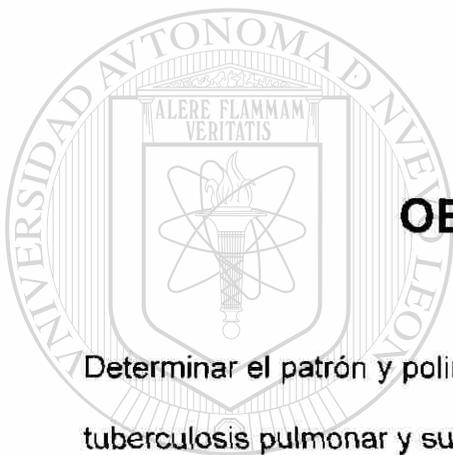


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **CAPITULO IV**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el patrón y polimorfismos de CD11c, CD14 y TLR4 en pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **CAPITULO V**

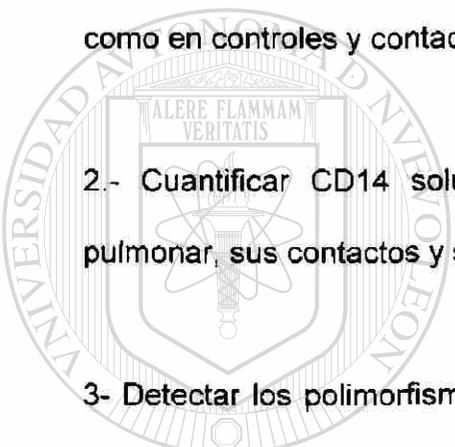
### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.- Determinar los niveles de expresión de CD11c, CD14 y TLR4 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar antes y después de tratamiento, así como en controles y contactos de los pacientes..

2.- Cuantificar CD14 soluble en suero de los pacientes con tuberculosis pulmonar, sus contactos y sujetos sanos.

3- Detectar los polimorfismos de CD11c, CD14 y TLR4 y su frecuencia en los pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.

4.- Realizar los análisis estadísticos comparativos de los resultados y correlacionarlos con la susceptibilidad a contraer la infección.



UANL

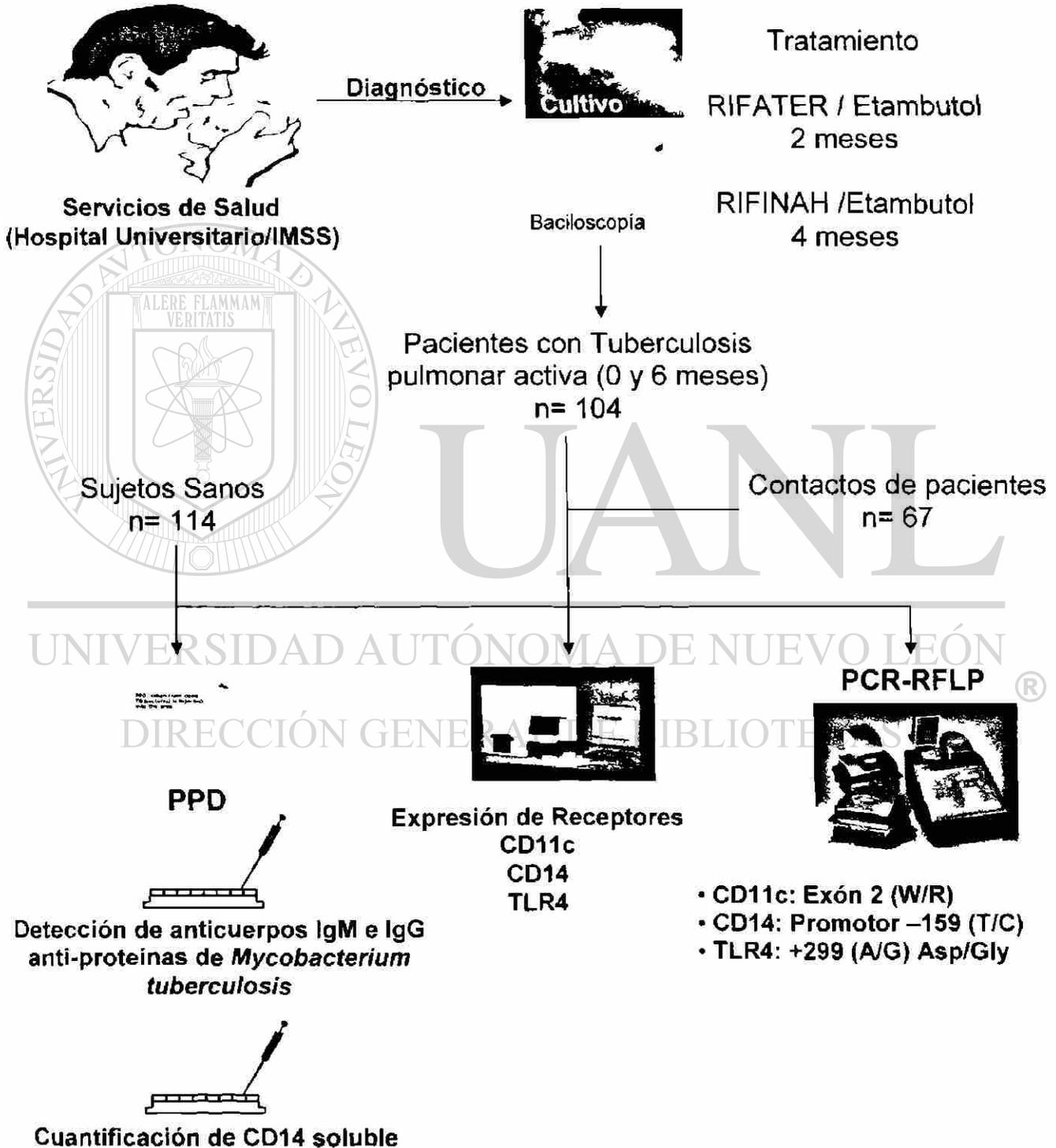
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## CAPITULO VI

### ESTRATEGIA GENERAL



## CAPITULO VII

### METODOLOGÍA

#### 7.1 Sujetos de estudio y criterios de selección.

Se seleccionaron 104 pacientes de reciente diagnóstico de tuberculosis pulmonar, 67 contactos de estos pacientes y 114 sujetos clínicamente sanos mayores de edad y previa firma de carta de consentimiento informado. Los pacientes con tuberculosis pulmonar fueron diagnosticados por baciloscopia y cultivo, así como también, se les practicó la prueba serológica para la detección de anticuerpos contra proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* (técnica que tiene una patente en trámite y desarrollada en nuestro laboratorio). Ningún paciente o sujeto de estudio estaban infectados con el virus de

inmunodeficiencia humana, no ingerían inmunosupresores o esteroides. El proyecto fue aprobado por el comité de investigación y bioética de la Facultad de Medicina, UANL, la cual se basa en los reglamentos internacionales estándar.

#### 7.2 ELISA detección anticuerpos IgM e IgG anti-proteínas extracelulares *M. tuberculosis* y cuantificación de CD14 soluble.

A todos los pacientes, contactos y sujetos sanos se les tomó 5 ml de sangre venosa periférica, se dejó coagular y se obtuvo el suero para la detección de

anticuerpos IgM e IgG anti-proteínas extracelulares *M. tuberculosis* empleando la técnica de ELISA indirecta y la cuantificación de CD14 soluble se realizó empleando un kit comercial de ELISA tipo sándwich (Biosource, Nivelles, Belgium).

### **7.3 Análisis de la expresión en membrana de CD11c, CD14 y TLR4**

Se tomaron 10 ml de sangre venosa periférica con EDTA como anticoagulante de los pacientes, contactos y sujetos sanos. A partir de la sangre completa se realizó la tinción de receptores de membrana, para esto se incubó con anticuerpos monoclonales para medir la expresión en membrana de los receptores anti-CD45-FITC (Santa Cruz, California, USA), anti-CD11c (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), , anti-CD14 (BD Biosciences

Pharmingen, San Diego, USA) y anti-TLR4 (Santa Cruz, California, USA), así como un control de isotipo (para eliminar la fluorescencia inespecífica, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Se realizaron lavados con FACS flow (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) y las muestras fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo marca Beckton Dickinson modelo FACS Sort Calibur (BD, San Jose California) y el software Cellquest. Los resultados fueron obtenidos mediante la impresión de gráficas (histogramas) e intensidad media de fluorescencia (IMF).

## **7.4 Extracción del ADN**

A partir de las muestras de sangre periférica de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos se extrajo el ADN mediante la técnica de TSNT.<sup>96</sup>

1.- Se recuperó el plasma rico en leucocitos por sedimentación de glóbulos rojos.

2.- El plasma fue centrifugado a 10,000 rpm/1 min a 4°C.

3.- El plasma fue descartado y el botón celular fue empleado para la extracción de ADN.

4.- Se añadieron 200 µl de solución de lisis TSNT (2% Tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA sódico) y la muestra se mezcló en un vortex.

5.- Se adicionaron 200 µl de fenol saturado y se mezcló por inversión.

6.- Se agregaron 200 µl de Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y se mezcló en un vortex hasta su homogenización.

7.- Se adicionaron 200 µl de TE 1X pH 8.0 ( EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM) y se mezcló por inversión y las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm/20 min a 4°C.

8.- La fase acuosa fue recuperada (fracción que contiene el ADN) y se adicionó 0.1V de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 1V de isopropanol para precipitar el ADN.

9.- Se dejó precipitar el ADN a -20°C durante 1h.

- 10.- Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm/15 min a 4°C.
- 11.- Se decantó el sobrenadante y el ADN fue lavado con 1V de etanol al 70%.
- 12.- Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm/10 min a 4°C, decantando el sobrenadante y secando la pastilla.
- 13.- El ADN fue resuspendido en TE 1X pH 8.0, aproximadamente 20-50 µl. Los ADNs resuspendidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.
- 14.- La calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y semicuantificó por espectrofotometría.

#### **7.5 Estandarización de las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Una vez obtenido el ADN se prosiguió con la estandarización de las PCRs. Los oligonucleótidos usados para la detección del SNPs del promotor de CD14/-159

y el SNP en TLR4/Asp299Gly fueron los reportados anteriormente por Baldini en 1999 y Arbour en el 2000.<sup>71,82</sup> Mientras los oligonucleotidos para el SNP en el exón 2 de CD11c fueron diseñados empleando el software Oligo 7.0 y ensayados en el software Amplify 2.0, las secuencias de los oligonucleótidos empleadas se observan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos para amplificar los genes estudiados y sus secuencias.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Secuencia de los oligonucleótidos</b>	<b>Referencia</b>
<b>CD11c</b>		
<b>Exón 2 (W/R)</b>	5' CCTCTTTCCCAGCCTTAGC 3' 5' AGCCTGGCACTGCACTTAC 3'	
<b>CD14</b>		
<b>Promotor -159 (T/C)</b>	5' GTGCCAACAGATGAGGTTAC 3' 5' GCCTCTGACAGTTTATGTAATC 3'	Baldini 1999
<b>TLR4</b>		
<b>Asp299Gly</b>	5' GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG 3' 5' GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC 3'	Arbour 2000

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

## 7.6 Condiciones de Amplificación

Para la estandarización de las condiciones de amplificación en las PCRs se utilizaron parámetros estándar de los reactantes, los cuales se fueron modificando para optimizarlos en cada una de las reacciones (ver tabla 3). Así mismo, los ciclos de temperaturas y tiempos dentro de los programas introducidos en el termociclador fueron optimizados para cada fragmento amplificado (tabla 4). Los tamaños de los productos amplificados variaron de 250-497 pb. Los productos amplificados fueron visualizados en geles de

agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y posteriormente fotodocumentados.

**Tabla 3.** Condiciones de PCR para los polimorfismos estudiados

Reactivos	Volumen por Reacción
Amortiguador Epicentre 10X	2.0 µl (1X)
Potenciador Epicentre 10X	2.0 µl (1X)
dNTPs Bioline (20 mM)	0.2 µl (200 µM)
MgCl <sub>2</sub> Epicentre 25 mM	1.2 µl (1.5 mM)
Primer 1 5µM	2.0 µl (0.5 µM)
Primer 2 5µM	2.0 µl (0.5 µM)
Taq ADN Polimerasa Epicentre (5U/µl)	0.18 µl (0.1U/µl)
ADN	1 µl (≈50 ng)
H <sub>2</sub> O milliQ	9.42 µl
Volumen final	20 µl

**Tabla 4.** Programa inicial de amplificación para los polimorfismos

Temperatura	Tiempo
1.- 95°C	2 min
2.- 94°C	40 seg
3.- 56-59°C*	40 seg
4.- 72°C	30 seg
5.- Repetir pasos 2-4/35 ciclos	
6.- 72°C	5 min

\*La temperatura de alineamiento varió según el producto del gen a amplificar.

## 7.7 Polimorfismos del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de diferentes tamaños generados por endonucleasas de restricción, para así identificar los polimorfismos presentes en un gen de interés. Los productos amplificados fueron digeridos dependiendo del SNP buscado, utilizando enzimas de la casa comercial Promega y New England Biolabs (tabla 5). En el anexo II se describen las condiciones específicas para cada enzima.

**Tabla 5.-** Reacciones de digestión para la detección de los polimorfismos

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
Producto amplificado	10
Amortiguador	1 (1X)
Enzima	1 (1 U)
Albúmina sérica bovina (ASB)	0.1 (100X)
H <sub>2</sub> O miliQ	7.9
Volumen final	20

Los fragmentos generados de las digestiones fueron verificados por electroforesis (5 V/cm) en geles de agarosa 2-4% teñidos en bromuro de etidio para la fácil identificación de las bandas generadas en la digestión.

## 7.8 Análisis de Resultados

Los resultados fueron evaluados empleando una serie de análisis estadísticos incluyendo también la estadística descriptiva. Se realizó un análisis múltiple de Dunn para la validación de resultados en la expresión de CD11c, CD14m/CD14s y TLR4, así como de la validación de los resultados de los genotipos y los niveles de CD14m/CD14s. Una prueba apareada de t de student fue empleada para comparar los valores de los 24 pacientes a los cuales se les realizaron los análisis a los 0 y 6-7 meses de tratamiento. Por otro lado, se realizó con la prueba de  $X^2$ , prueba exacta de Fisher en tabla de 2x2 fueron realizados para evaluar las variaciones de las frecuencias genotípicas y alélicas. Las proporciones de probabilidades (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% para determinar la probabilidad y el riesgo de la enfermedad. La

---

diferencia estadística fue establecida para los valores de  $P < 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron empleando software estadísticos como el SPSS versión 10.0 y GraphPad Prism 4.

## **CAPÍTULO VIII**

### **RESULTADOS**

#### **8.1 Muestras para el estudio**

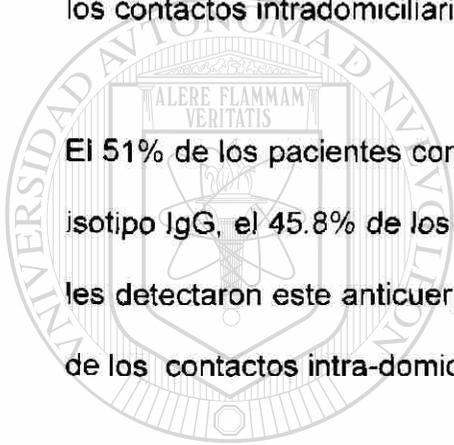
En el estudio se incluyeron 104 pacientes con tuberculosis pulmonar activa que acudieron al Instituto Mexicano del Seguro Social U.M.F. No. 28 y al Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias del Hospital Universitario durante el periodo de Diciembre 2004 a Agosto 2006, 67 contactos de estos pacientes [hijos(as), esposo(a), hermanos(as), padres] y 114 sujetos clínicamente sanos.

#### **6.2 Características de la población**

La proporción entre hombres y mujeres fue similar en los grupos de estudio, 50.9% sexo femenino fue encontrado en el grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar, 53.5% en el grupo de sujetos sanos y 64.2% en el grupo de contactos intra-domiciliarios. El promedio de edad en el grupos se encontró entre 27.2-42.2 años. Todos los pacientes con tuberculosis pulmonar y los contactos intra-domiciliarios fueron positivos al PPD, mientras el 56% de los sujetos sanos fueron positivos al PPD.

La detección de anticuerpos del isotipo IgM e IgG anti-proteínas del filtrado de *Mycobacterium tuberculosis* fue realizado para todos los grupos, a partir de los sueros de los sujetos sanos se estableció un punto de corte para ser considerado positivo ( $> 0.3$  densidades ópticas de absorbancia). El 76% de los pacientes con tuberculosis pulmonar (0 meses) presentaron anticuerpos IgM, el 4% de los 24 pacientes con 6-7 meses de tratamiento para IgM y el 58.2% de los contactos intradomiciliarios de los pacientes para este anticuerpo (Figura 3).

El 51% de los pacientes con tuberculosis pulmonar presentaron anticuerpos del isotipo IgG, el 45.8% de los pacientes después de 6-7 meses de tratamiento se les detectaron este anticuerpo y el 38.8% de los contactos (Figura 4). El 10.5% de los contactos intra-domiciliarios desarrollaron tuberculosis pulmonar.



UANL

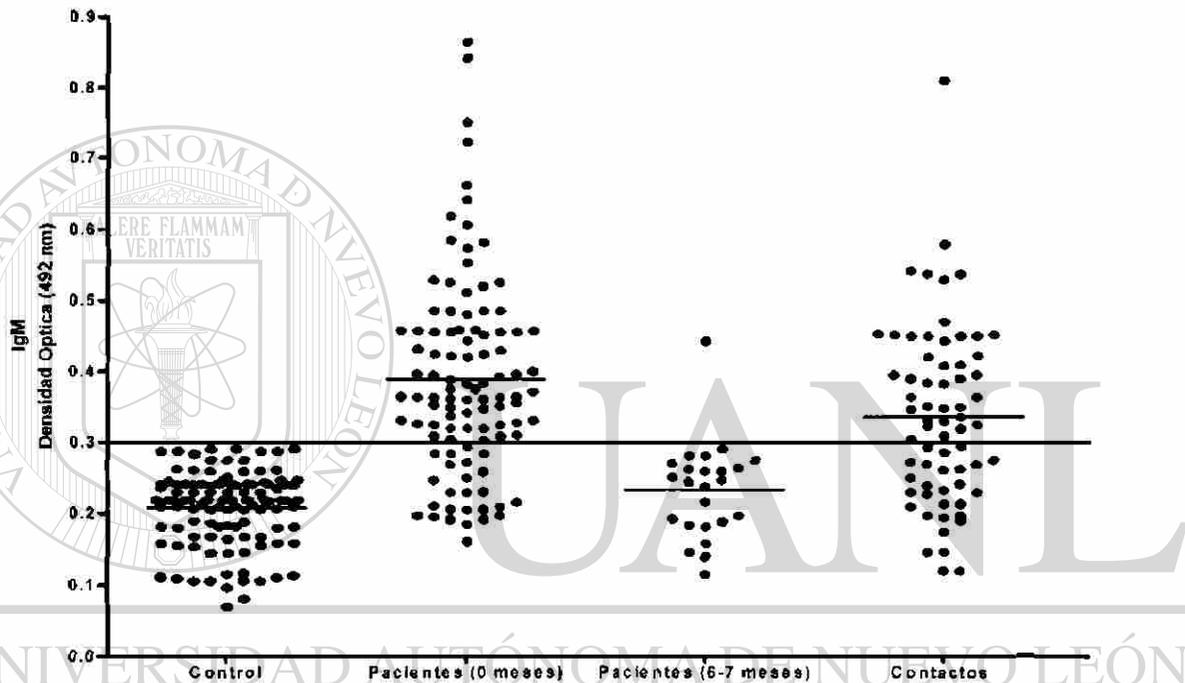
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



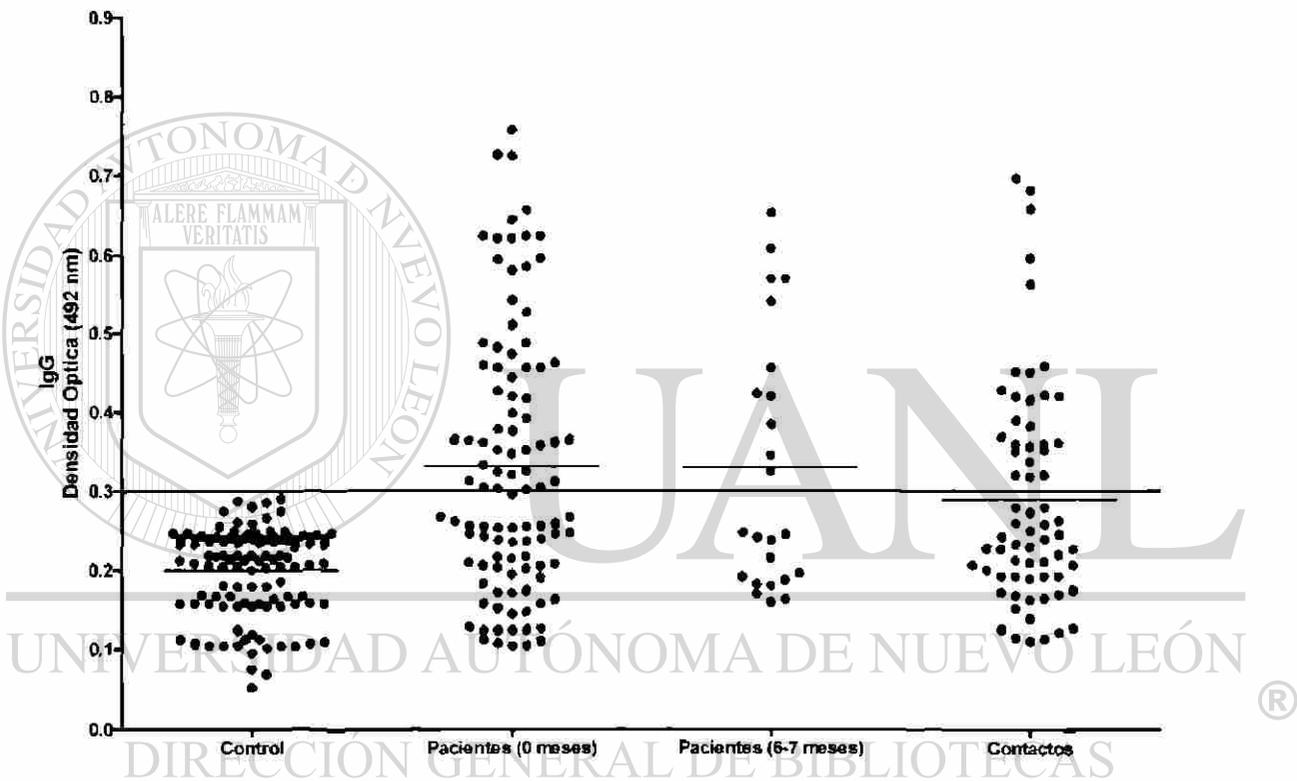
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### Detección de anticuerpos IgM anti-proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*



**Figura 3.** Detección de anticuerpos IgM anti-proteínas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* en sueros de controles (n=114), pacientes con tuberculosis pulmonar antes del tratamiento (n=104), pacientes con tuberculosis pulmonar con 6-7 meses de tratamiento antifímico (n=24) y contactos intradomiciliarios (n=67).

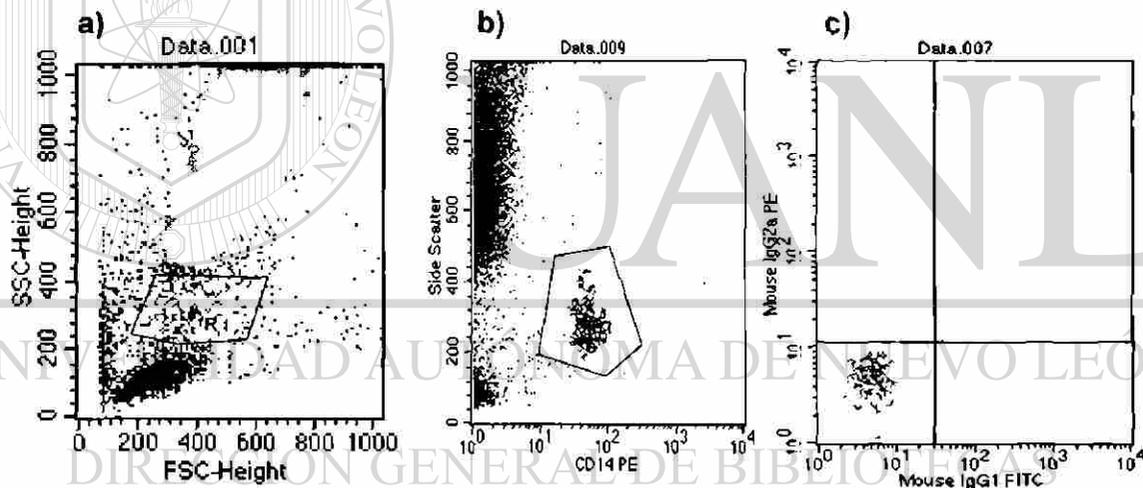
### Detección de anticuerpos IgG anti-proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*



**Figura 4.** Detección de anticuerpos IgG anti-proteínas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* en sueros controles (n=114), pacientes con tuberculosis pulmonar antes del tratamiento (n=104), pacientes con tuberculosis pulmonar con 6-7 meses de tratamiento antifímico (n=24) y contactos intradomiciliarios (n=67).

### 8.3 Expresión de CD11c, CD14 y TLR4 en monocitos de cada uno de los sujetos de estudio.

Las muestras analizadas de cada uno de los sujetos de estudio fueron incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para cada receptor de interés. Las muestras fueron adquiridas y analizadas en un citómetro de flujo, en donde se delimitó a trabajar con los monocitos de cada muestra en estudio y se eliminó la fluorescencia inespecífica (Figura 5).



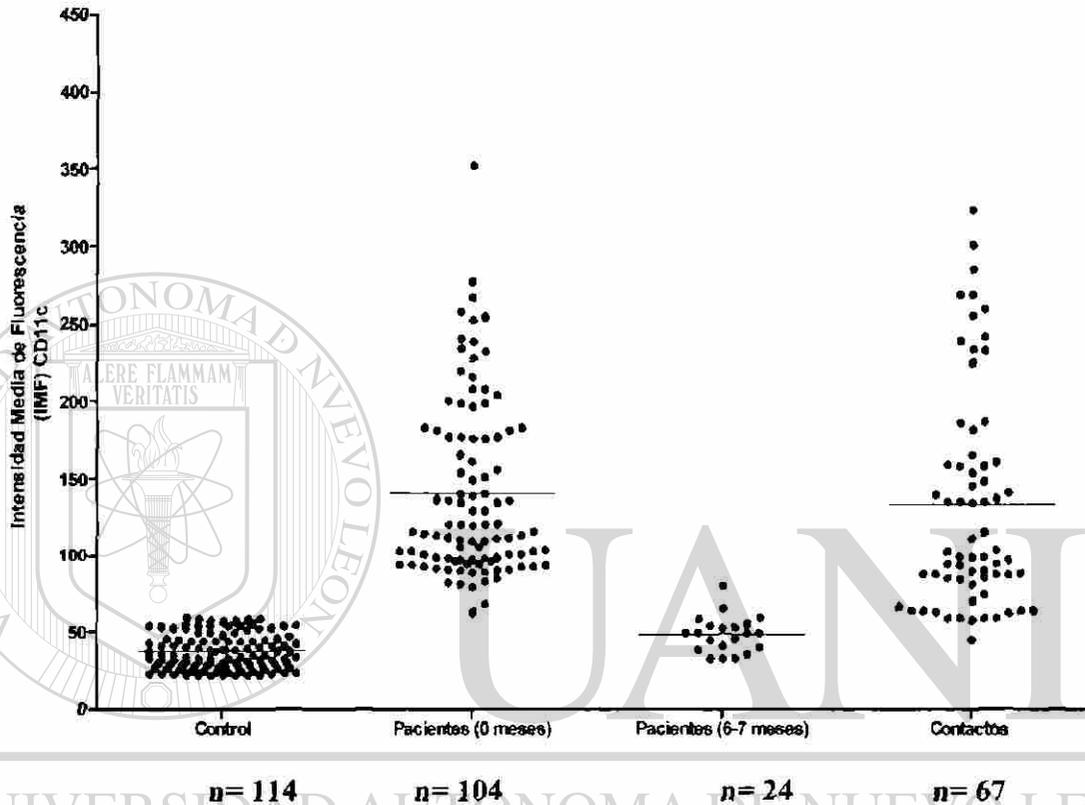
**Figura 5.** Selección de la población para analizar la expresión de CD11c, CD14 y TLR4. a) Gráfica de puntos de una muestra donde se indica la selección del área correspondiente a los monocitos denominada región 1; b) verificación de la región de monocitos, lo cuales expresan constitutivamente el receptor CD14; y c) ajuste para la eliminación de la fluorescencia inespecífica.

### 8.3.1 Expresión de CD11c en monocitos

La expresión de CD11c en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa se encontró elevada al momento del diagnóstico (antes del tratamiento antifímico) en comparación con los controles [117.14 intensidad media de fluorescencia, IMF (rango 62.75-352.68) versus 35.29 IMF (rango 21.75-59.74),  $P < 0.001$ ], la cual disminuyó a niveles similares a los controles después de 6-7 meses de tratamiento [49.3 IMF (rango 32.79-79.60),  $P > 0.05$ ]. No se encontró diferencia significativa entre los niveles de CD11c entre pacientes antes del tratamiento y contactos [117.14 IMF (rango 62.75-352.68) versus 105.52 IMF (rango 44.95-324.13),  $P > 0.05$ ], pero si entre los contactos y el grupo control,  $P < 0.001$  (Figura 6).

Por otro lado, se realizó un análisis apareado de los 24 pacientes, a los cuales se les realizó la toma de dos muestras (0 y 6-7 meses de tratamiento). Los resultados muestran que los monocitos de los pacientes tienen altos niveles de CD11c antes de recibir el tratamiento, pero estos niveles disminuyen a los 6-7 meses de tratamiento de forma significativa,  $P < 0.001$  (Figura 7).

### Expresión de CD11c en la membrana de monocitos



**Figura 6.** Niveles de expresión de CD11c en monocitos de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar a los 0 y 6-7 meses de tratamiento, así como, de los contactos de los pacientes. Los resultados fueron evaluados empleando la prueba múltiple de Dunn.

### Expresión de CD11c en monocitos

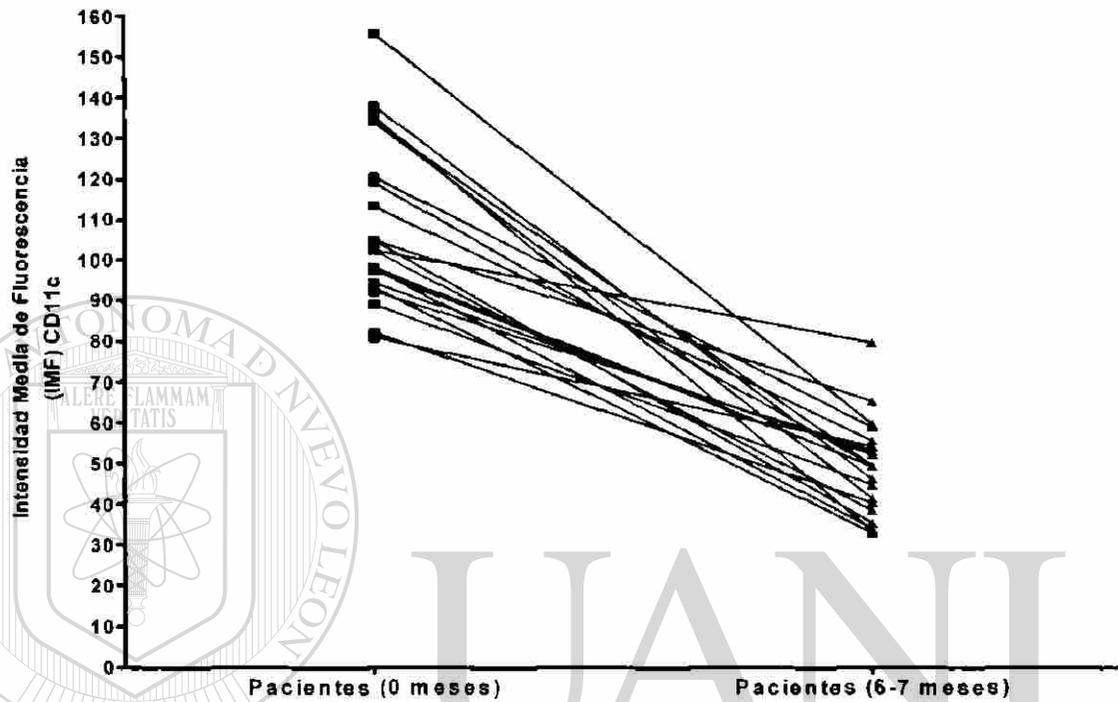


Figura 7. Niveles de expresión de CD11c en los monocitos de los 24 pacientes

antes y 6-7 meses de tratamiento. Se muestra una disminución de la expresión de CD11c a los 6-7 meses de tratamiento, la cual fue estadísticamente

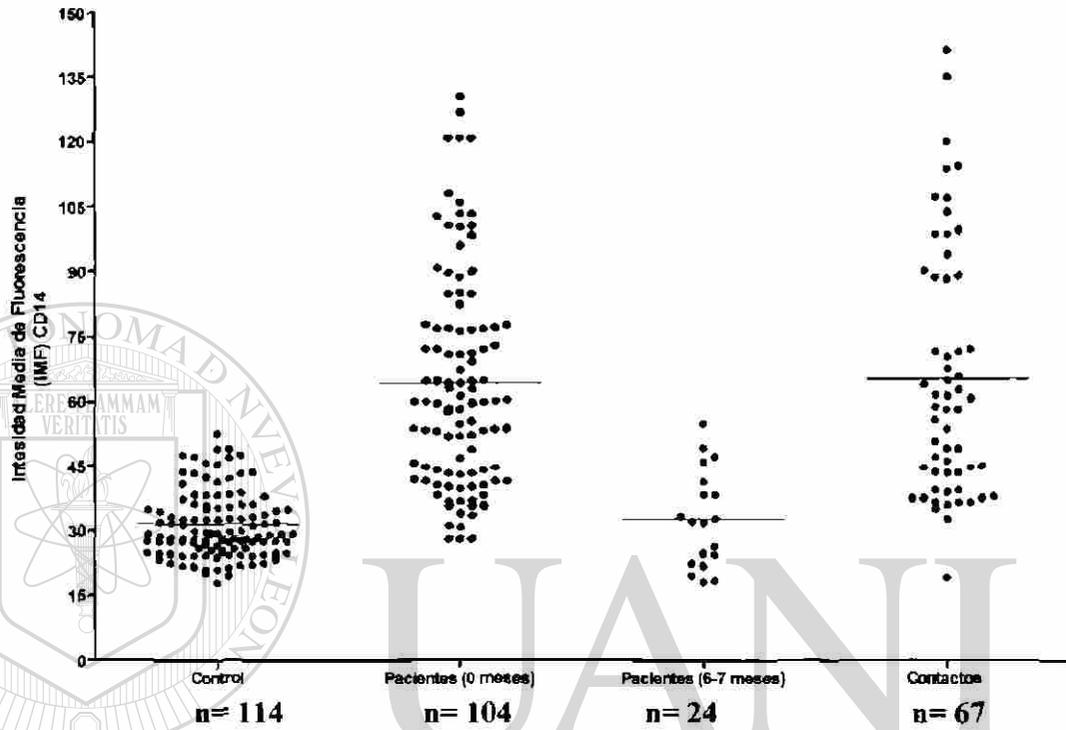
significativa y fue evaluada empleando la prueba de t de student pareado.

### 8.3.2 Expresión de CD14 en monocitos

La expresión de CD14 fue alta en los monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar antes del tratamiento [59.95 IMF [rango, 28.15-130.3] vs 29.11 IMF [rango, 17.85-52.53], respectivamente;  $P < 0.001$ ), la cual disminuyó a niveles similares a los controles después de 6-7 meses de tratamiento [31.96 IMF (rango 17.85-54.60),  $P > 0.05$ ]. No se encontró diferencia significativa entre los niveles de CD14 entre pacientes antes del tratamiento y contactos [59.95 IMF [rango, 28.15-130.3] versus 58.52 IMF (rango 19.21-141.1),  $P > 0.05$ ], pero si entre los contactos y el grupo control,  $P < 0.001$  (Figura 8).

Por otro lado, se realizó un análisis apareado de los 24 pacientes, a los cuales se les realizó la toma de dos muestras (0 y 6-7 meses de tratamiento). Los resultados muestran que los monocitos de los pacientes tienen altos niveles de CD14 antes de recibir el tratamiento, pero estos niveles disminuyen a los 6-7 meses de tratamiento de forma significativa,  $P < 0.001$  (Figura 9).

### Expresión de CD14 en monocitos



**Figura 8.** Se muestra los niveles de expresión de CD14 en monocitos de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar a los 0 y 6-7 meses de tratamiento, así como, de los contactos de los pacientes. Los resultados fueron evaluados empleando la prueba múltiple de Dunn.

### Expresión de CD14 en monocitos

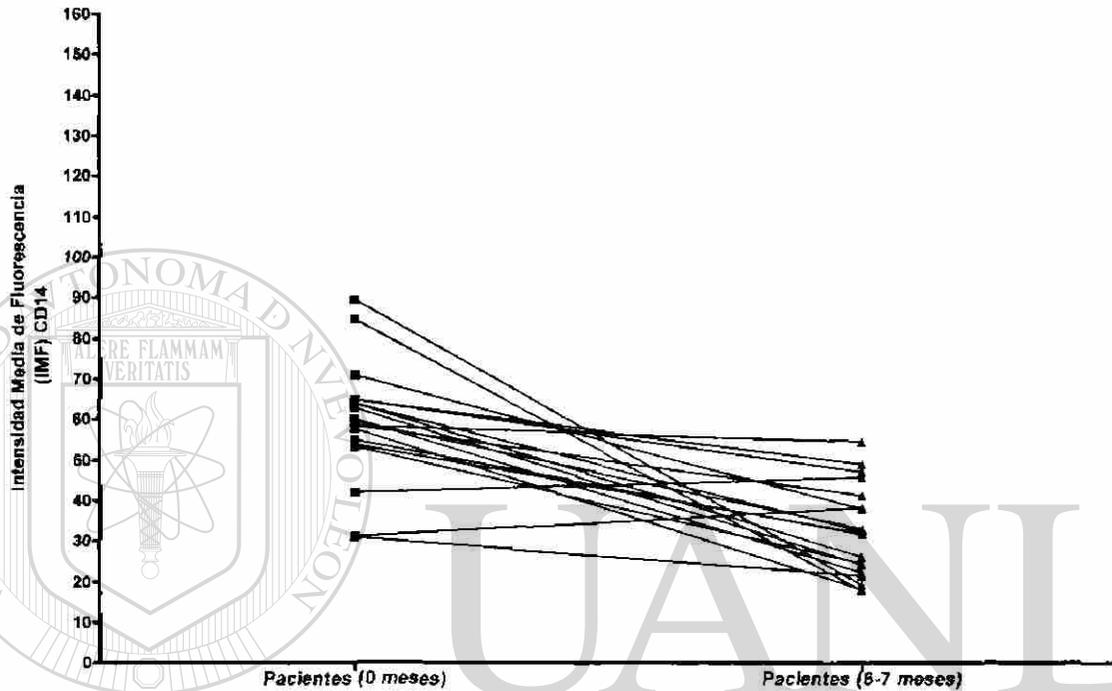


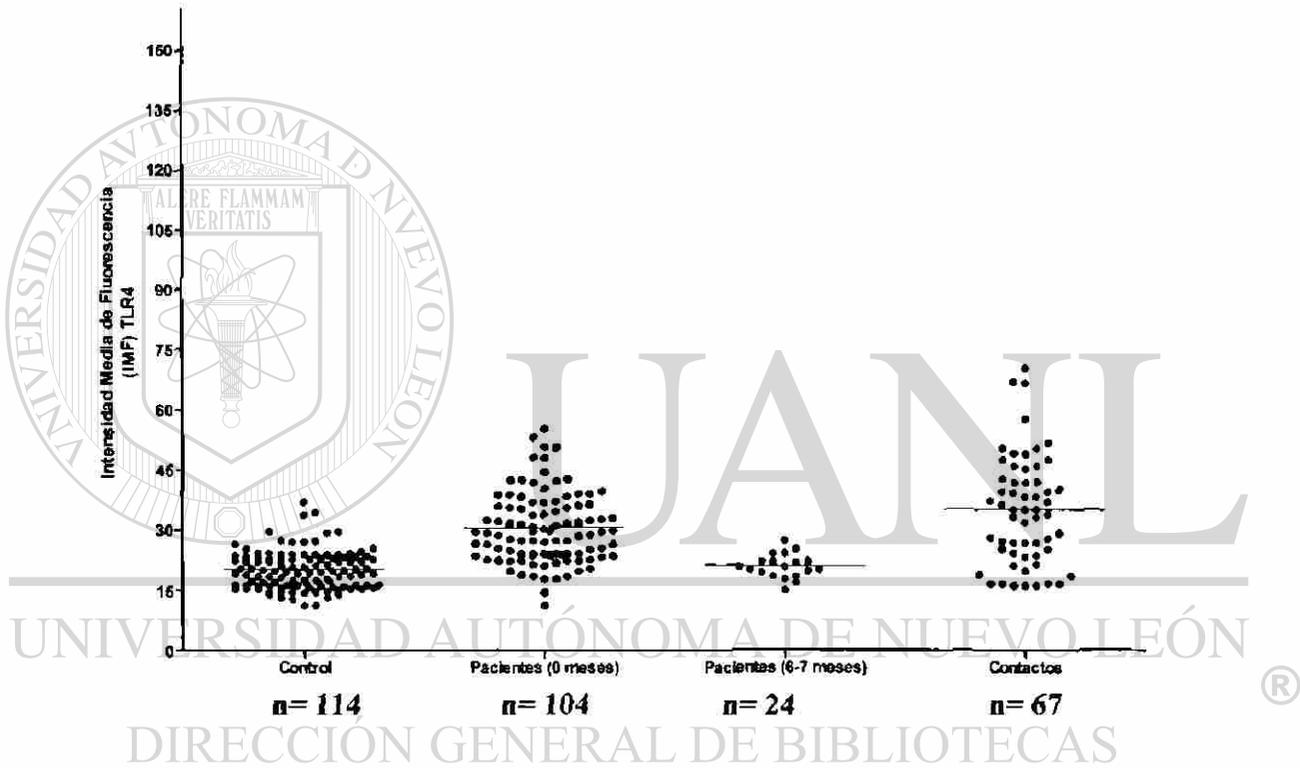
Figura 9. Se muestra la expresión de CD14 en los monocitos de los 24 pacientes que se logró evaluar los niveles a los 0 meses y 6-7 meses de tratamiento. Se muestra una disminución de la expresión de CD14 a los 6-7 meses de tratamiento, la cual fue estadísticamente significativa y fue evaluada empleando la prueba de t de student pareado.

### 8.3.3 Expresión de TLR4 en monocitos

Los niveles de expresión de TLR4 fue alta en los monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar antes del tratamiento en comparación con los controles [29.40 IMF [rango, 11.29-55.22] vs 19.51 IMF [rango, 11.11-37.06], respectivamente;  $P < 0.001$ ), la cual disminuyó a niveles similares a los controles después de 6-7 meses de tratamiento [20.72 IMF (rango 14.90-27.48),  $P > 0.05$ ]. No se encontró diferencia significativa entre los niveles de CD14 entre pacientes antes del tratamiento y contactos [29.40 IMF [rango, 11.29-55.22] versus 35.00 IMF (rango 16.12-70.22),  $P > 0.05$ ], pero si con el grupo control ( $P < 0.001$ ), figura 10.

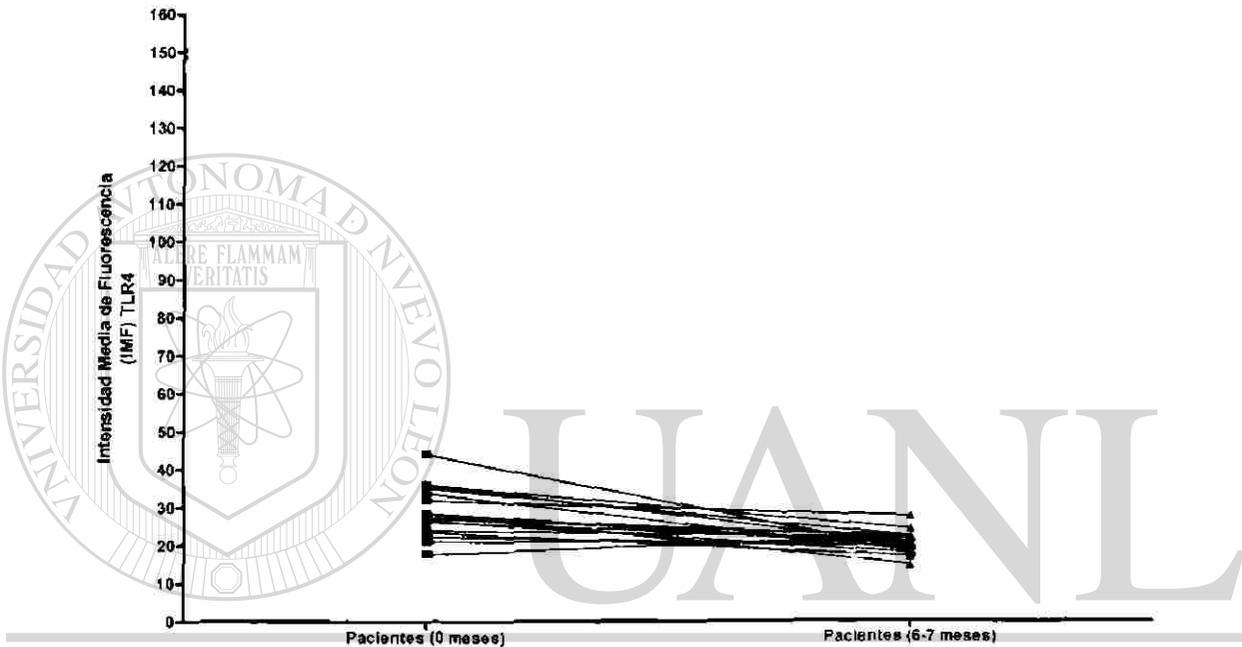
El análisis apareado de los 24 pacientes muestran que los monocitos de los pacientes tienen altos niveles de TLR4 antes de recibir el tratamiento, pero estos niveles disminuyen a los 6-7 meses de tratamiento de forma significativa,  $P < 0.001$  (Figura 11).

### Expresión de TLR4 en monocitos



**Figura 10.** Se muestra los niveles de expresión de TLR4 en monocitos de controles, pacientes con tuberculosis pulmonar a los 0 y 6-7 meses de tratamiento, así como, de los contactos de los pacientes. Los resultados fueron evaluados empleando la prueba múltiple de Dunn.

### Expresión de TLR4 en monocitos



**Figura 11.** Se muestra la expresión de TLR4 en los monocitos de los 24 pacientes que se logró evaluar los niveles a los 0 meses y 6-7 meses de tratamiento. Se muestra una disminución de la expresión de TLR4 a los 6-7 meses de tratamiento, la cual fue estadísticamente significativa y fue evaluada empleando la prueba de t de student pareado.

## 8.4 Cuantificación de CD14s en sueros

### 8.4.1 Curva de Calibración

Los niveles de CD14s fueron cuantificados por el método de ELISA tipo sándwich, para ellos se trazó una curva, con estándares proporcionados por la casa comercial, la cual se empleó para la cuantificación de CD14 en las muestras de sueros de nuestros grupos (Figura 12).

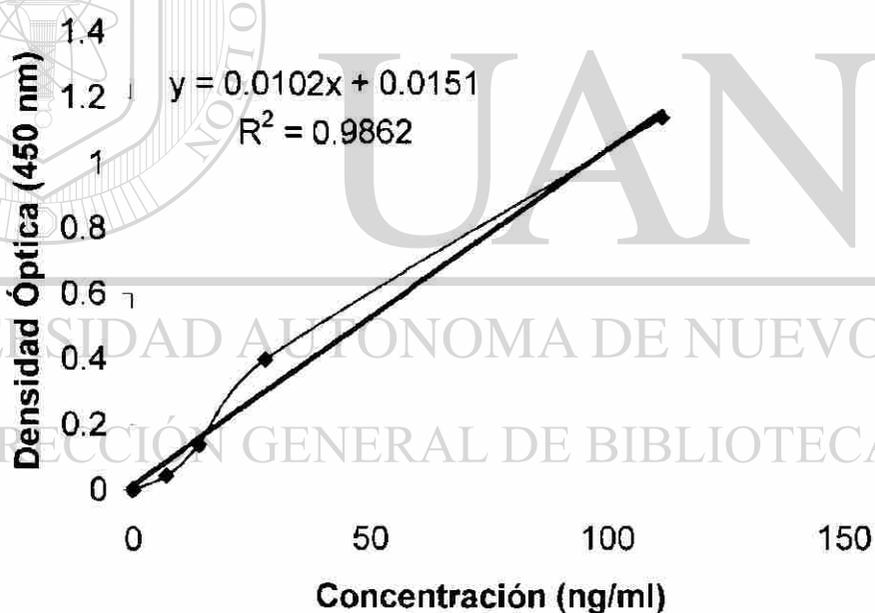


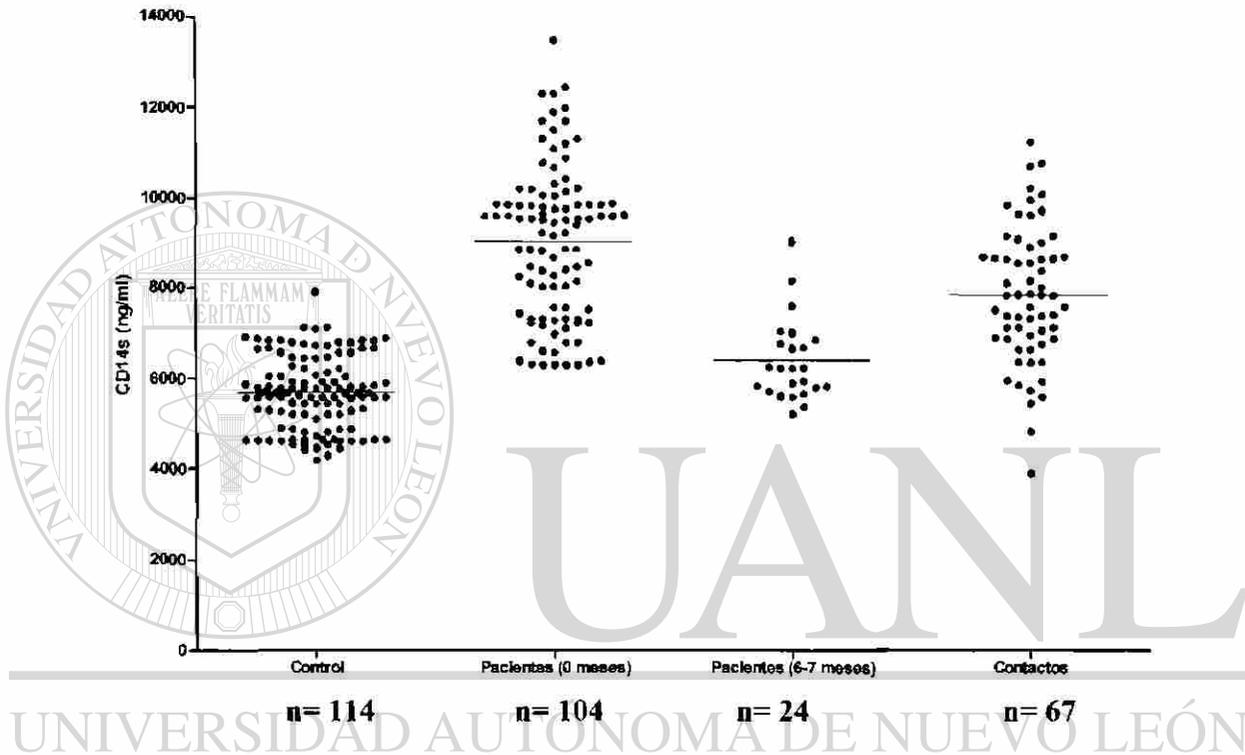
Figura 12. Curva de calibración de CD14s empleando estándares de concentración conocida en el rango de 0 a 112 ng/ml.

#### 8.4.2 Niveles de CD14s en suero

La concentración de CD14s en sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar antes del tratamiento se encontró alta en comparación al grupo control [9406 ng/ml [rango, 6305-13480] vs 5663 n/ml [rango, 4198-7905], respectivamente;  $P < 0.001$ ), la cual disminuyó a niveles similares a los controles después de 6-7 meses de tratamiento [6198 ng/ml (rango 5195-9014),  $P > 0.05$ ]. Los niveles de CD14s en los pacientes antes del tratamiento fueron mayores que en los contactos [9406 ng/ml [rango, 6305-13480] versus 7831 ng/ml (rango 3910-11250),  $P < 0.05$ ]. Sin embargo, los contactos presentaron altos niveles de CD14s en comparación al grupo control ( $P < 0.001$ ), figura 13.

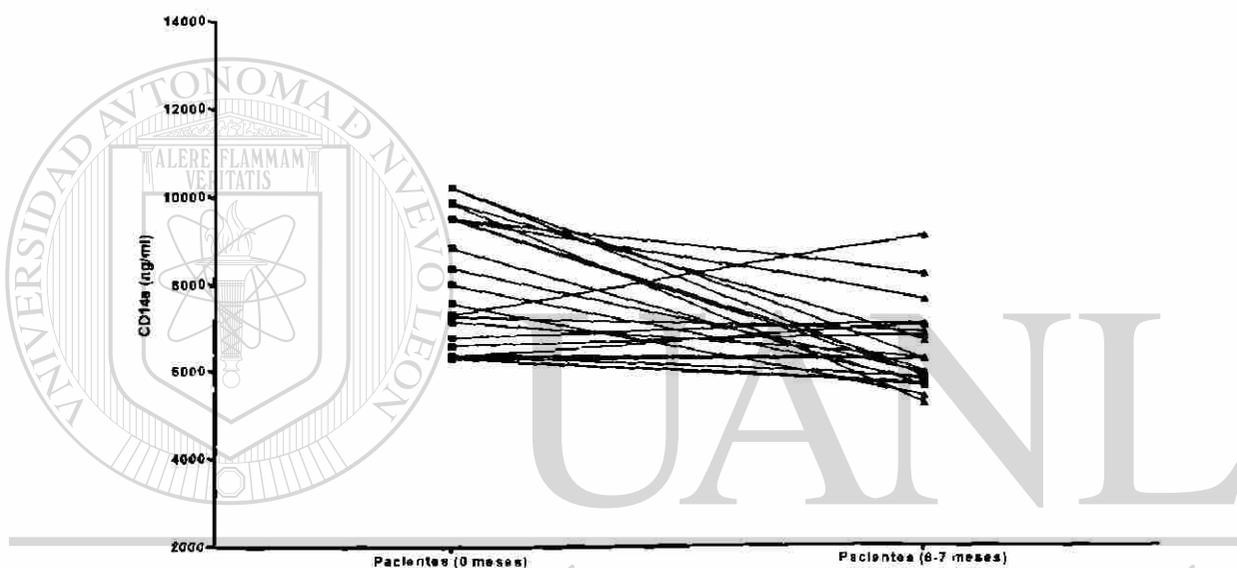
Por otro lado, se realizó un análisis apareado de los 24 pacientes, a los cuales se les realizó la toma de dos muestras (0 y 6-7 meses de tratamiento). Los resultados muestran que los pacientes presentaron altos niveles de CD14s antes de recibir el tratamiento, pero estos niveles disminuyen a los 6-7 meses de tratamiento de forma significativa,  $P < 0.01$  (Figura 14).

### Cuantificación de CD14s



**Figura 13.** Niveles séricos de CD14 soluble en muestras de sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar antes y después del tratamiento antifímico y de sus contactos. Se observa el incremento de CD14s en los pacientes con TBP antes del tratamiento y sus contactos ( $P < 0.001$ ), pero este disminuye después de 6-7 meses de tratamiento antifímico ( $P > 0.05$ ).

### Cuantificación de CD14s



**Figura 14.** Se muestran los niveles de CD14s en sueros de los 24 pacientes para los cuales se logró evaluar los niveles a los 0 meses y 6-7 meses de tratamiento. Se muestra una disminución de CD14s a los 6-7 meses de tratamiento, la cual fue estadísticamente significativa y fue evaluada empleando la prueba de t de student pareado.

### 8.5 Comparación de los niveles de CD11c, CD14m/CD14s y TLR4 en contactos IgM positivos y negativos

Los niveles de CD11c, CD14 y TLR4 fueron comparados inter-grupo de contactos, los cuales fueron divididos en aquellos contactos que presentaron anticuerpos del isotipo IgM (lo cual indica contacto reciente con el microorganismo) anti-proteínas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* y aquellos que no presentaron estos anticuerpos. Los niveles de expresión de CD14 y TLR4 son similares en los monocitos de estos individuos y no se encontró diferencia significativa al realizar los análisis estadísticos ( $P > 0.05$ ). Por otro lado, los niveles de CD11c y CD14 fueron altos en los contactos

---

que presentaron los anticuerpos IgM en comparación con aquellos que no, esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $P < 0.001$  y  $P < 0.05$ , respectivamente) (Figura 15).

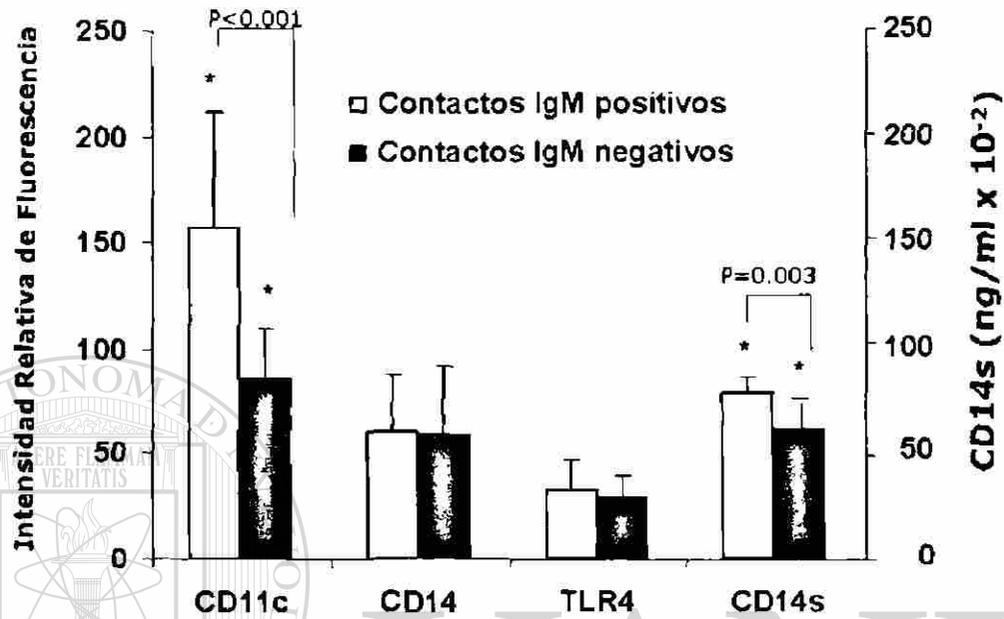
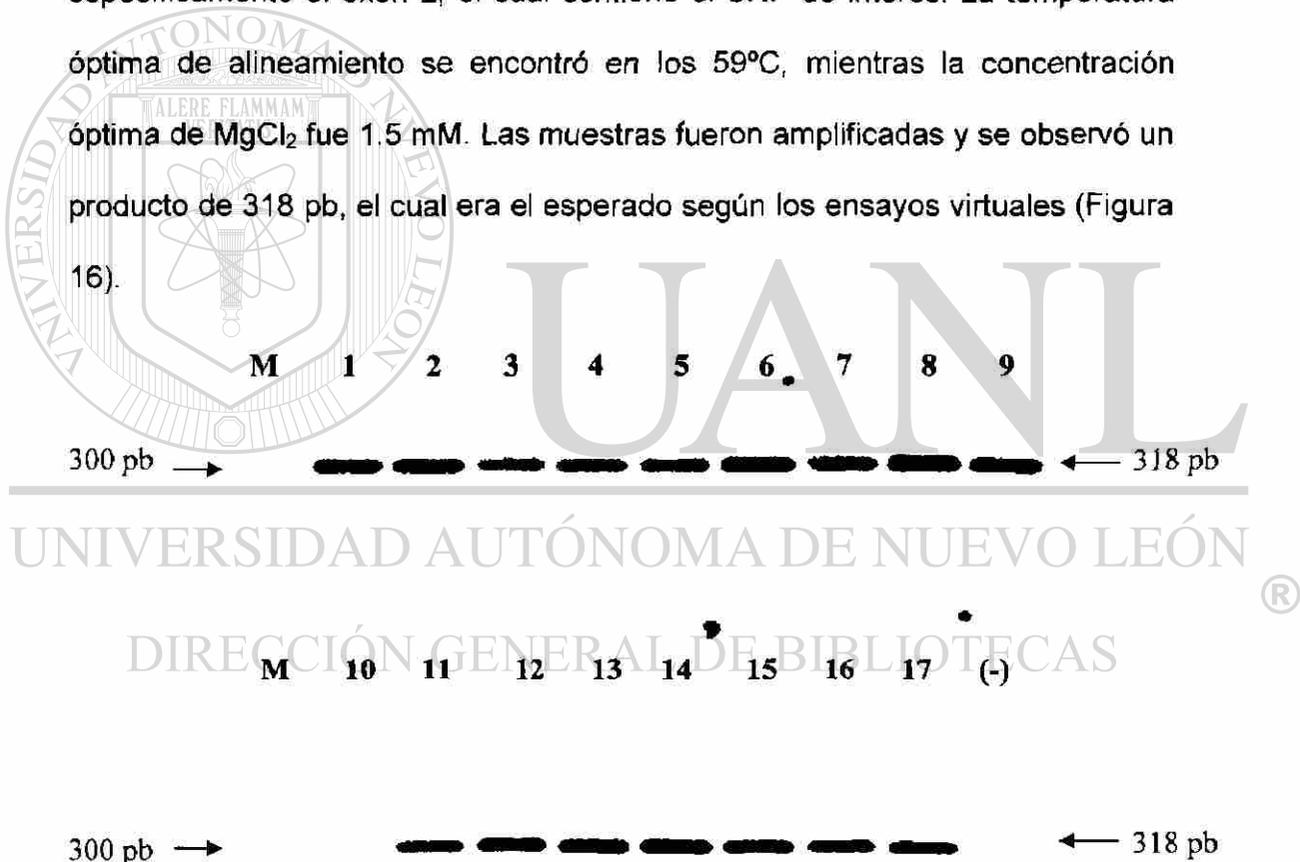


Figura 15. Niveles de CD11c, CD14m/CD14s y TLR4 en contactos IgM positivos e IgM negativos.

## 8.6 Amplificación de los productos de CD11c, CD14 y TLR4

### 8.6.1 Amplificación del exón 2 del gen *cd11c*

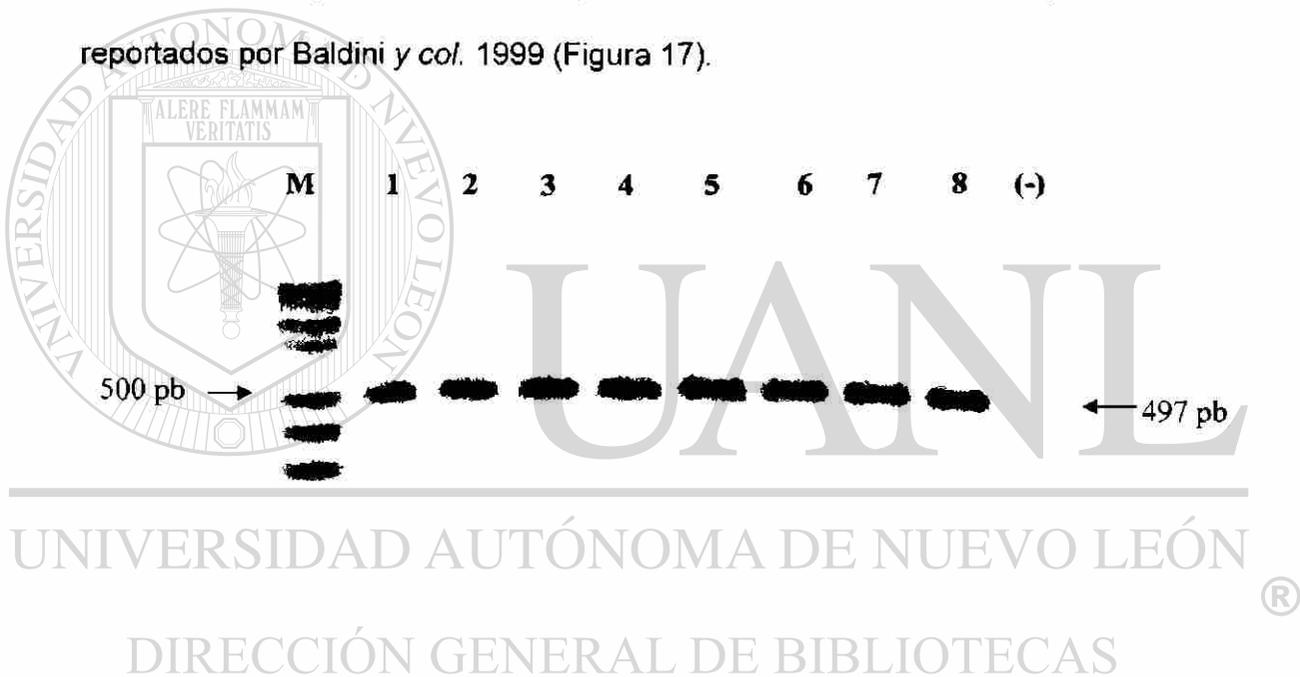
Una vez obtenidos los ADN de cada uno de los individuos de los diferentes grupos, se estandarizó la técnica para amplificar un fragmento del gen *cd11c*, específicamente el exón 2, el cual contiene el SNP de interés. La temperatura óptima de alineamiento se encontró en los 59°C, mientras la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> fue 1.5 mM. Las muestras fueron amplificadas y se observó un producto de 318 pb, el cual era el esperado según los ensayos virtuales (Figura 16).



**Figura 16.** Amplificación del exón 2 del gen *cd11c*. Gel de agarosa al 2% muestra el primer carril el marcador de peso molecular (marcador de la marca Novagen del cual se visualizan 10 bandas de 100 pb cada una). Los siguientes carriles muestran la amplificación de  $\approx 50$  ng de ADN de diferentes muestras un control negativo fue empleado para el control de calidad de la amplificación.

### 8.6.2 Amplificación del promotor del gen *cd14*

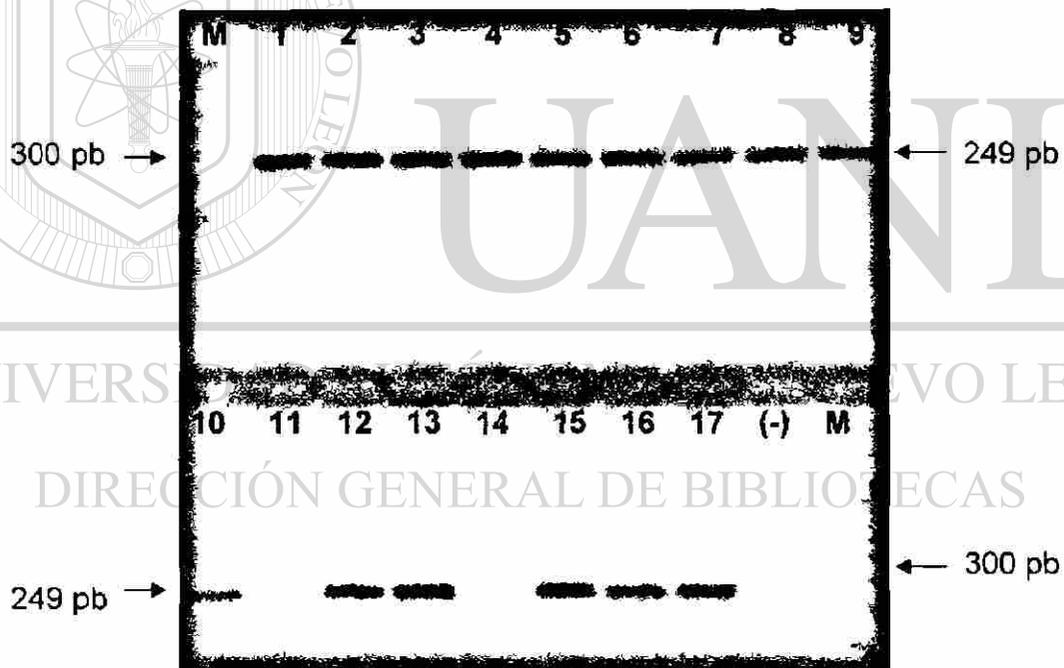
Se re-estandarizó la técnica de PCR para amplificar el fragmento correspondiente al promotor del gen *cd14*, el cual contiene el SNP de interés. La temperatura óptima de alineamiento se encontró en los 56°C, mientras la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> fue 1.5 mM. Las muestras fueron amplificadas y se observó un producto de 497 pb, el cual era el esperado según datos reportados por Baldini y col. 1999 (Figura 17).



**Figura 17.** Amplificación del promotor del gen *cd14*. Gel de agarosa al 2% muestra el primer carril el marcador de peso molecular (marcador de la marca Novagen del cual se visualizan 10 bandas de 100 pb cada una). Los siguientes carriles muestran la amplificación de ≈50 ng de ADN de diferentes muestras un control negativo fue empleado para el control de calidad de la amplificación.

### 8.6.3 Amplificación del exón 4 del gen *tlr4*

Se re-estandarizó la técnica de PCR para amplificar el fragmento correspondiente al fragmento localizado en el exón 4 del gen *tlr4*, el cual contiene el SNP de interés. La temperatura óptima de alineamiento se encontró en los 58°C, mientras la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> fue 1.5 mM. Las muestras fueron amplificadas y se observó un producto de 249 pb, el cual era el esperado según datos reportados por Arbort y col. 2000 (Figura 18).



**Figura 18.** Amplificación de un fragmento localizado en el exón 4 de *tlr4*. Gel de agarosa al 2% muestra en el primer y el último carril el marcador de peso molecular (marcador de la marca Novagen del cual se visualizan 10 bandas de 100 pb cada una). Los siguientes carriles muestran la amplificación de  $\approx 50$  ng de ADN de diferentes muestras un control negativo fue empleado para el control de calidad de la amplificación.

## 8.7 Análisis del Polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP)

### 8.7.1 Detección del SNP en el exón 2 *cd11c*/T→C

Una vez que se tenían los productos amplificados y verificados que la banda correspondiera a 318 pb en geles de agarosa al 2%, los productos fueron digeridos enzimáticamente empleando *Nci* I. En la figura 19 pueden observarse los fragmentos resultantes.

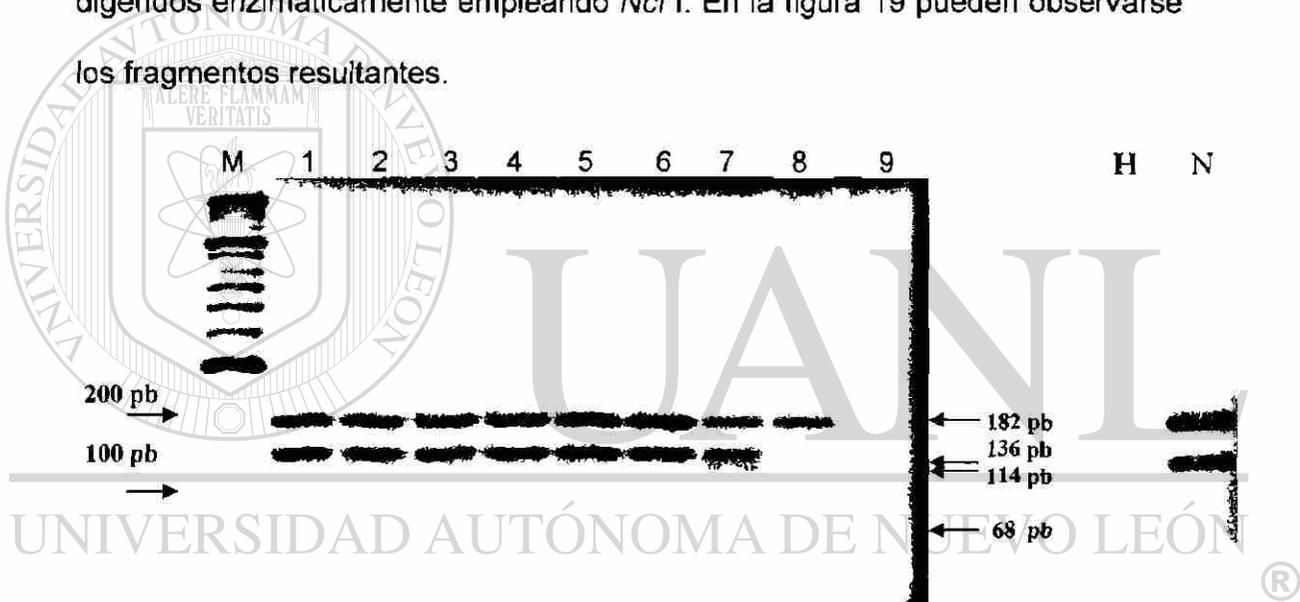
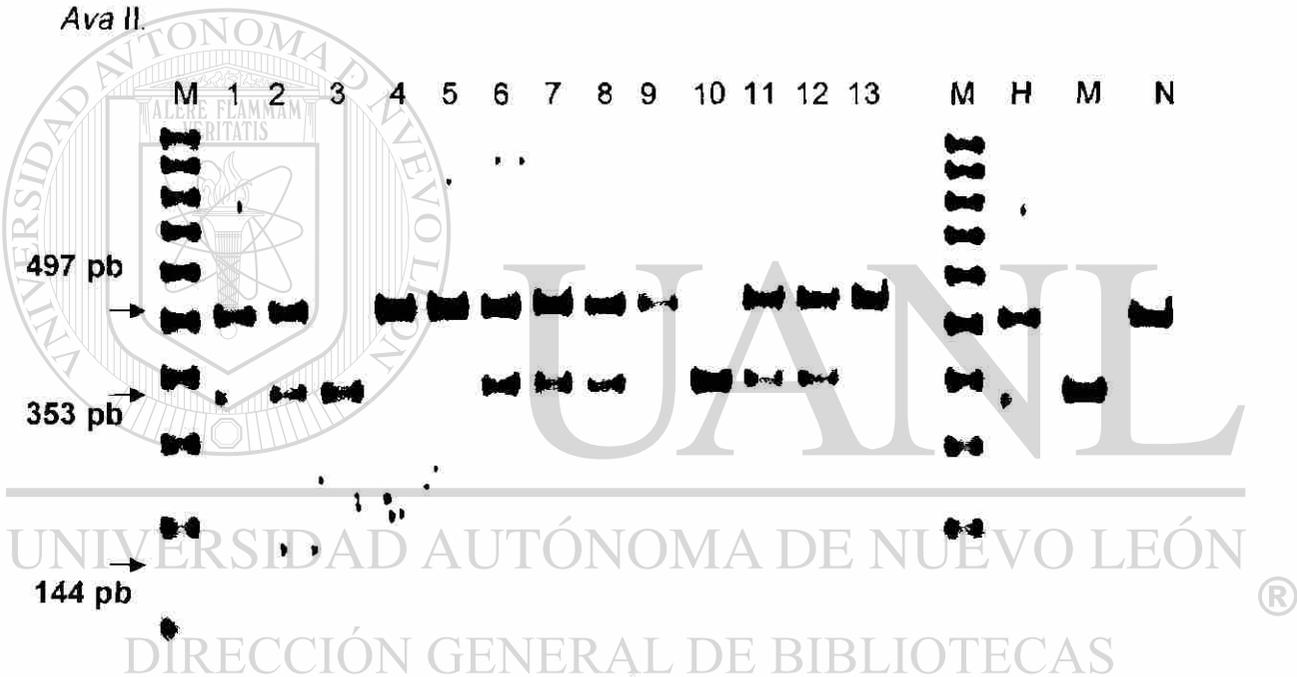


Figura 19. Detección del SNP en el exón 2 del gen *cd11c*. En la parte derecha se observa una imagen de gel de agarosa, el carril indicado con la letra H representa al heterocigoto T/C (182, 136, 114 y 68 pb) y el carril N representa al homocigoto normal T/T (182 y 136 pb). En la parte izquierda se encuentra el gel de agarosa al 4 %, el marcador y se observa que las muestras 7,8 y 9 son heterocigotas T/C, las muestras 1-6 son homocigotas T/T, el carril M corresponde al marcador de peso molecular (Bioline).

### 8.7.2 Detección del SNP en el promotor del gen *cd14*-159 C→T

Una vez que se tenían los productos amplificados y verificados que la banda correspondiera a 497 pb en geles de agarosa al 2%, los productos fueron digeridos enzimáticamente empleando *Ava* II. En la figura 20 pueden observarse los fragmentos resultantes de la digestión enzimática empleando

*Ava* II.



**Figura 20.** Detección del SNP localizado en el promotor del gen *CD14*-159. En la parte derecha se observa el gel de agarosa, el carril con la letra H representa al heterocigoto C/T (497, 353 y 144 pb); el carril M representa al homocigoto mutado T/T (353 y 144 pb); y finalmente el carril N representa al homocigoto normal C/C (497 pb). En la parte izquierda se encuentra el gel de agarosa al 2.5%, el marcador y se observa que las muestras 1, 2, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 son heterocigotas T/C, las muestras 3 y 10 son homocigotas T/T y las muestras 4, 5 y 13 son homocigotas C/C y el carril M representa el marcador de peso molecular (*Novagen*).

### 8.7.3 Detección del SNP en el exón 4 del gen *tlr4*/Asp299Gly A→G

Una vez que se tenían los productos amplificados y verificados que la banda correspondiera a 249 pb en geles de agarosa al 2%, los productos fueron digeridos enzimáticamente empleando *Nco* I. En la figura 21 pueden observarse los fragmentos resultantes de la digestión enzimática empleando *Nco* I.



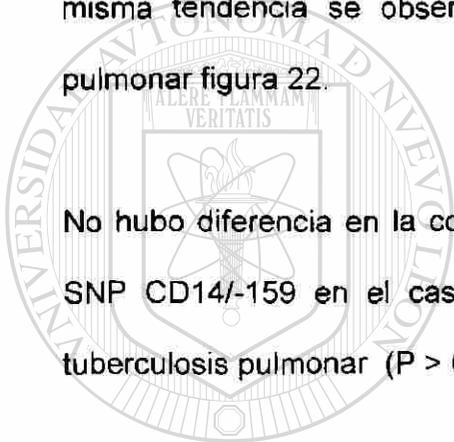
#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 21.** En la parte derecha se observa el esquema de gel de agarosa, el carril indicado con la letra N representa al homocigoto A/A (249 pb); el carril H representa al heterocigoto G/A (249 y 223 pb). En la parte izquierda se encuentra el gel de agarosa al 3.5%, el marcador y se observa que las muestras 38,40-44 y 47-51 son homocigotas A/A y las muestras 39 y 46 son heterocigotas G/A. y el carril M representa el marcador de peso molecular (Novagen).

### **8.8 Asociación de los genotipos del polimorfismo del promotor del gen *cd14/-159* con los niveles de CD14m/CD14s**

La expresión de CD14 en los monocitos es similar en los sujetos sanos con diferentes genotipos para el polimorfismo del gen de CD14/-159 ( $P > 0.05$ ), esta misma tendencia se observó también para los pacientes con tuberculosis pulmonar figura 22.

No hubo diferencia en la concentración de CD14s entre los genotipos para el SNP CD14/-159 en el caso de los sujetos sanos ni de los pacientes con tuberculosis pulmonar ( $P > 0.05$ ), figura 23.



UANL

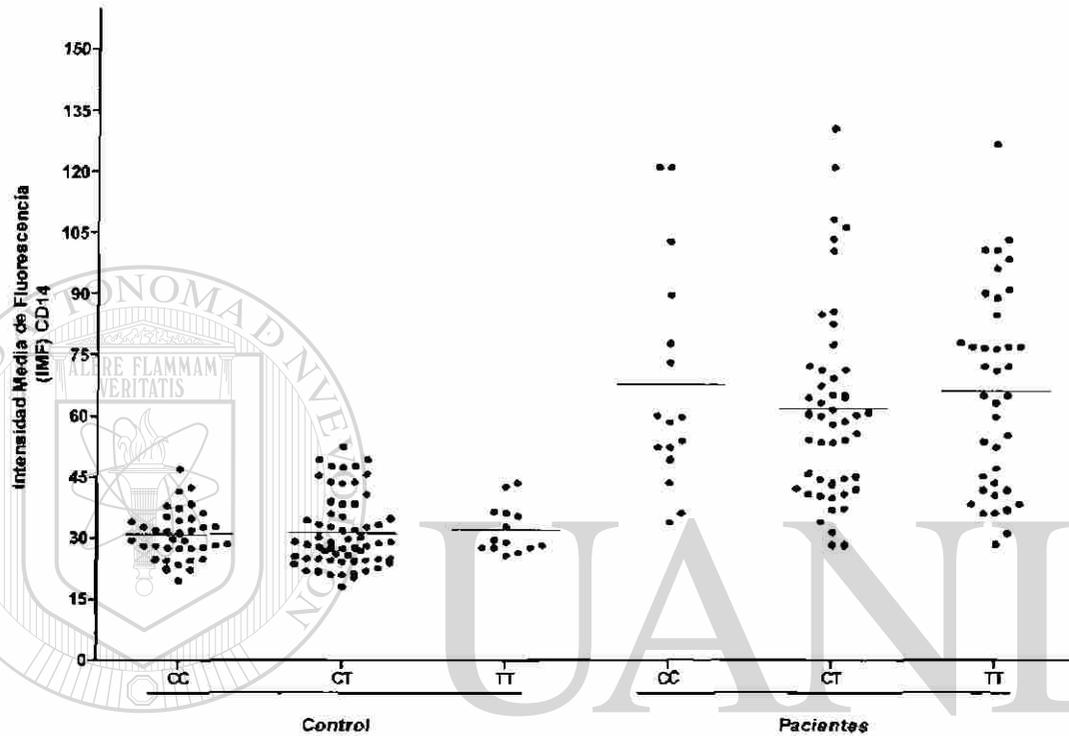
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



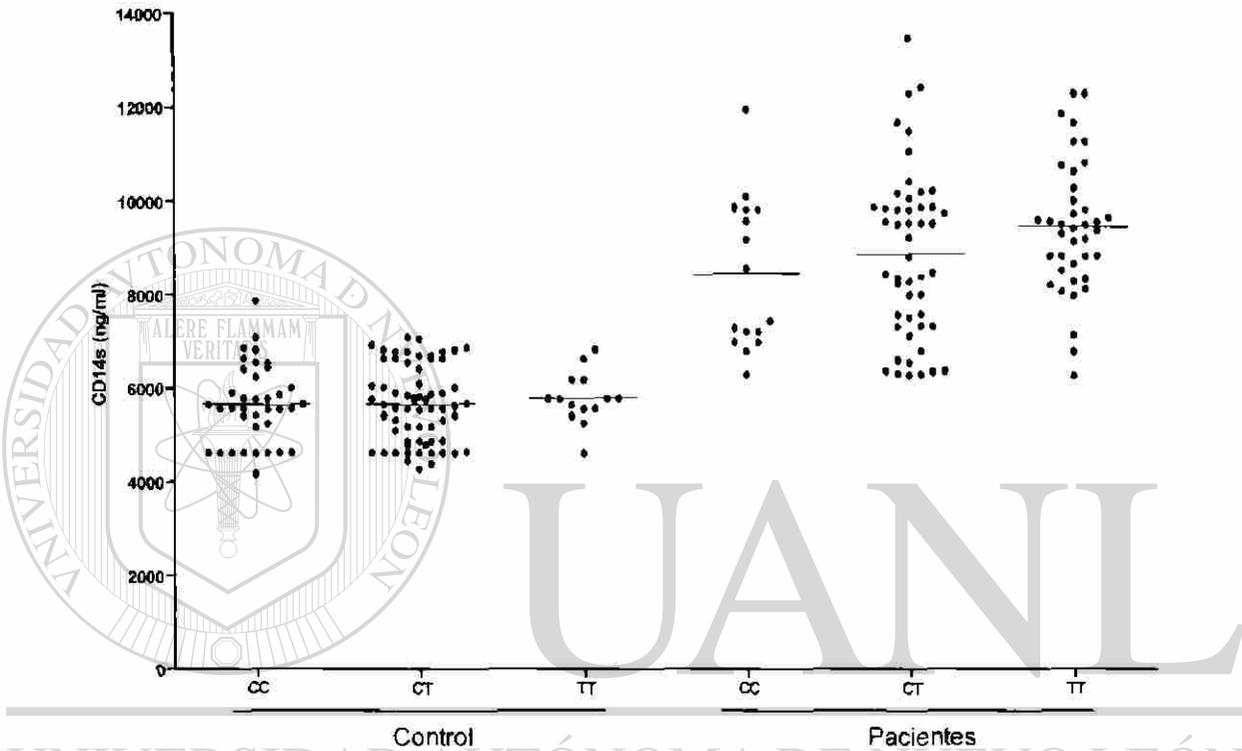
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### Asociación de genotipos de CD14/-159 y CD14 de membrana



**Figura 22.** Asociación de la expresión de CD14 en monocitos de controles y pacientes con tuberculosis pulmonar con los genotipos del SNP encontrado en el promotor del gen de CD14/-159.

### Asociación de genotipos de CD14/-159 y CD14s



**Figura 23.** Asociación de la concentración de CD14s en sueros de controles y pacientes con tuberculosis pulmonar con los genotipos del SNP encontrado en el promotor del gen de CD14/-159.

## **8.9 Análisis de frecuencias Alélicas y genotipos**

Los genotipos y los alelos de los SNPs presentes en CD11c/exón 2 T C, el promotor del gen de CD14/-159 C T y del exón 4 del gen de TLR4/Asp299Gly A G fueron obtenidos de 114 controles, 104 pacientes con tuberculosis pulmonar y 67 contactos y analizados para determinar si existía alguna asociación con el desarrollo o susceptibilidad a tuberculosis pulmonar.

### **8.9.1 Frecuencias de genotipos y alelos del SNP en CD11c/exón 2 T →C**

El homocigoto TT en el SNP encontrado en el exón 2 del gen de CD11c fue el más frecuente en todos los grupos analizados (89.5-95.6%), también se encontraron algunos sujetos que fueron heterocigotos (T/C), pero no se

encontró el homocigoto CC en nuestra población de estudio. Las frecuencias de los genotipos de toda la población estudiada fue del 94.03% para el homocigoto TT y 5.96% para el heterocigoto.

El alelo T fue más frecuente en los grupos de estudio con 94.8, 97.6 y 97.8% en contactos, pacientes con tuberculosis pulmonar y controles, respectivamente. La frecuencia de los alelos de toda la población estudiada fue del 97.01% para el alelo T y 2.99% para el alelo C. No se encontró diferencia significativa entre las frecuencias genotípicas y alélicas en los grupos analizados (Tabla 6).

**Tabla 6.** Frecuencias de genotipos y alelos en el exón 2 del gen CD11c/T→C en controles, pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.

Genotipos	Control	Pacientes	Contactos	OR (IC 95%)
n (%)		TBP		P
TT	109 (95.6)	99 (95.2)	60 (89.5)	1.101 (0.309-3.917)
				P = 0.567*
TC	5 (4.4)	5 (4.8)	7 (10.5)	
CC	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Total	114 (100)	104 (100)	67 (100)	
<b>Alelo</b>				
<b>n (%)</b>				
T	223 (97.8)	203 (97.6)	127 (94.8)	1.099 (0.313-3.805)
				P = 0.566*
C	5 (2.2)	5 (2.4)	7 (5.2)	
Total	228 (100)	208 (100)	134 (100)	

El número en el paréntesis indica la frecuencia.

\*Comparación entre las frecuencias de los controles y pacientes con tuberculosis pulmonar empleando la Prueba exacta de Fisher.

### **8.9.2 Frecuencias de genotipos y alelos del SNP en el promotor CD14/-159**

La frecuencia del genotipo CD14/-159 TT fue alta en los pacientes con tuberculosis pulmonar (35.6%) comparada con el grupo control (12.3%),  $P < 0.0001$ . La frecuencia del genotipo heterocigoto fue muy similar en todos los grupos (entre 40.3-55.3). La frecuencia del genotipo CD14/-159 TT en los contactos fue del 22.4%, pero de los 7 contactos que desarrollaron tuberculosis pulmonar el 50% tenían este genotipo. Las frecuencias de los genotipos de toda la población estudiada fue del 27.37% para el homocigoto CC, 49.47% para el heterocigoto CT y 23.16% para el homocigoto TT.

Las frecuencias alélicas de CD14/-159 T fueron estadísticamente altas en los pacientes con tuberculosis pulmonar ( $P < 0.0001$ ) comparadas con el control (60 y 40%, respectivamente) (Tabla 7). La frecuencia alélica de toda la población estudiada fue del 52.01% para el alelo C y 47.99% para el alelo T.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla 7.** Frecuencias de genotipos y alelos en el promotor del gen de CD14/-159 C→T en controles, pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.

Genotipos n (%)	Control	Pacientes TBP	Contactos	OR (IC 95%) P
CC	37 (32.4)	16 (15.4)	25 (37.3)	6.112 (2.613-14.296)  P < 0.0001*
CT	63 (55.3)	51 (49)	27 (40.3)	
TT	14 (12.3)	37 (35.6)	15 (22.4)	
Total	114 (100)	104 (100)	67 (100)	
<b>Alelo</b> n (%)				
C	137 (60)	83 (39.9)	77 (57.5)	2.267 (1.545-3.328)  P < 0.0001*
T	91 (40)	125 (60.1)	57 (42.5)	
Total	228 (100)	208 (100)	134 (100)	

El número en el paréntesis indica la frecuencia.

\*Comparación entre las frecuencias de los controles y pacientes con tuberculosis pulmonar empleando la Prueba exacta de Fisher.

### **8.9.3 Frecuencias de genotipos y alelos del SNP en TLR4/Asp299Gly A→G**

No se encontraron diferencias entre las frecuencias de los genotipos de TLR4/Asp299Gly entre los pacientes con tuberculosis pulmonar y los controles, cuyas frecuencias para el homocigoto AA fueron muy similares (90.4 y 96.5%, respectivamente). Las frecuencias de los heterocigotos fueron bajas pero similares en todos los grupos analizados (entre 3.5-8.3%). El homocigoto GG no fue encontrado en nuestra población de estudio. Las frecuencias de los genotipos de toda la población estudiada fue del 93.33% para el homocigoto AA y 6.67% para el heterocigoto AG.

El alelo A fue el más frecuente en nuestra población, pero no se encontró diferencia significativa entre los grupos analizados, ver tabla 8. La frecuencia alélica de toda la población estudiada fue del 96.7% para el alelo A y 3.3% para el alelo G.

**Tabla 8.** Frecuencias de genotipos y alelos en el SNP TLR4/Asp299Gly en controles, pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos.

Genotipos	Control	Pacientes	Contactos	OR (IC 95%)
n (%)		TBP		P
AA	110 (96.5)	94 (90.4)	62 (92.5)	6.112 (2.613-14.296)
				<i>P</i> = 0.096*
AG	4 (3.5)	10 (9.6)	5 (7.5)	
GG	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Total	114 (100)	104 (100)	67 (100)	
<b>Alelo</b>				
<b>n (%)</b>				
A	224 (98.2)	198 (95.2)	129 (96.3)	2.227 (1.545-3.328)
				<i>P</i> = 0.101*
G	4 (1.8)	10 (4.8)	5 (3.7)	
Total	228 (100)	208 (100)	134 (100)	

El número en el paréntesis indica la frecuencia.

\*Comparación entre las frecuencias de los controles y pacientes con tuberculosis pulmonar empleando la Prueba exacta de Fisher.

## CAPÍTULO IX

### DISCUSIÓN

La tuberculosis es un problema de salud mundial, la cual se creía controlada a principios de los 60's, pero ha incrementado nuevamente con la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y de nuevas cepas drogo-resistentes. No obstante lo anterior, muchos factores se suman para aumentar la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar, entre ellos se encuentran: la diabetes mellitus, la carga genética (tanto del huésped como del patógeno), las drogas inmunosupresoras, la autoinmunidad, la nutrición, la edad, el abuso de alcohol, la falta de programas de control, entre otros.<sup>97-99</sup> Los mecanismos de interacción molecular huésped-parásito se encuentran descritos para *M. tuberculosis* a través de moléculas como CD11c y CD14, las cuales se encuentran involucradas en la entrada de la micobacteria a la célula huésped.

Por su parte, TLR4 se comporta como un coreceptor de CD14. La interacción del complejo LPS-CD14-TLR4 participa en la inducción de la respuesta inmune celular contra la micobacteria. Actualmente, la búsqueda de biomarcadores específicos de diversas enfermedades se ha intensificado, por lo que en la tuberculosis no se han hecho esperar dichos estudios. El objetivo de este estudio fue el establecer si CD14m/CD14s y TLR4 pudieran ser candidatos como biomarcadores de la evolución de la tuberculosis pulmonar.

Adicionalmente, se decidió estudiar el receptor de complemento tipo 4 (CD11c), CD14 y TLR4 como biomarcadores asociados con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar, debido a los pocos estudios que existen en relación a éstos y la tuberculosis.

Este estudio aporta datos sobre los niveles de CD11c, CD14m/CD14s y TLR4 en monocitos de cada uno de los grupos estudiados, así como de las frecuencias de los polimorfismos estudiados en cada uno de los genes y su posible asociación con la tuberculosis pulmonar.

La expresión de CD11c en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar, así como en los contactos fue alta. Nuestros datos, concuerdan con resultados publicados previamente para otras enfermedades infecciosas. Stent en 1994,

menciona un incremento significativo en la IMF de CD11c sobre monocitos de pacientes infectados con VIH;<sup>100</sup> mientras que Brunealti y col. en el 2006, refirieron un incremento en la expresión de CD11c en pacientes con choque séptico.<sup>101</sup>

En este estudio se encontró que los pacientes con tuberculosis pulmonar presentaron altos niveles de CD14 a la superficie de los monocitos, así como también altos niveles séricos de CD14s antes de iniciar el tratamiento antituberculoso. Sin embargo, ambos valores, tanto de CD14 de membrana como de CD14 soluble disminuyeron después de 6-7 meses de tratamiento. Resultados similares han sido reportados en diferentes muestras, por ejemplo Hoheisel y

col. en 1995 encontraron niveles elevados de CD14 soluble en fluido de lavado broncoalveolar de pacientes con tuberculosis pulmonar.<sup>58</sup> Jufferman y col. en 1998 y Pacheco y col. en 2004, reportaron altos niveles de CD14 soluble en sueros de pacientes con tuberculosis activa, los cuales disminuyen durante el tratamiento antifímico como se observó también en este trabajo.<sup>102-103</sup> En este año nosotros reportamos que los monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar presentaron altos niveles de CD14 de membrana.<sup>33</sup>

En este trabajo se observó que no solo los pacientes con tuberculosis pulmonar tenían altos niveles de CD14m y CD14s, sino también los contactos intradomiciliarios de estos pacientes, datos contrarios fueron reportados por Juffermans, quien no encontró diferencia significativa entre los valores de CD14 soluble entre sus controles y los contactos empleados en su estudio. Sin embargo, nuestros datos confirman lo reportado por otros investigadores y

sugieren que puedan ser biomarcadores de pronóstico o de respuesta al tratamiento antifímico.<sup>102-103</sup> El incremento en los niveles de CD14 juega un papel importante en la activación de la respuesta inmune mediada a través de este receptor y su coreceptor TLR4, lo cual es esencial en etapas tempranas de la infección. Sin embargo, los incrementos de CD14m y CD14s no son específicos de la tuberculosis, datos similares han sido encontrados en otras patologías tanto infecciosas como no infecciosas tales como: brucelosis, choque séptico, sarcoidosis, pacientes infectados con el VIH o enfermedades autoinmunes.<sup>57,101,104-106</sup>

En nuestros resultados reportamos altos niveles de TLR4 en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar antes de iniciar su tratamiento antifímico y dichos niveles disminuyeron de manera similar a los de CD11c y CD14 después de 6-7 meses de tratamiento. Yan y col. en el 2004, reportaron que el LPS induce el incremento en la expresión de TLR4 sobre la superficie de células mononucleares.<sup>107</sup> Como en el caso de CD14, los niveles de TLR4 se han encontrado elevados en diversas patologías tales como: sepsis, sepsis severa, choque séptico, así como también con el virus de la hepatitis C.<sup>101,108</sup>

El genotipo TT y el alelo T para el SNP en el gen *cd11c* fueron los más frecuentes en nuestra población (94 y 97%, respectivamente). No se encontró diferencia significativa entre los grupos estudiados. Las frecuencias son semejantes a las reportadas para poblaciones Asiáticas y Africanas, según el

---

GeneCard, donde en ambos casos el 100% de la población estudiada presentó el genotipo TT.<sup>38</sup> Por otro lado, difiere de las reportadas para la población Europea. Poco se conoce de la asociación de este polimorfismo con enfermedades, pero existen otros SNP en el gen de CD11c como en el SNP localizado en el exón 9 y en la región 3' no traducible, los cuales han sido asociados con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn.<sup>39</sup>

La frecuencia del alelo T del promotor del gen *cd14* en el grupo control fue de 40% cercano a lo reportado por otros autores con grupos controles de diferentes países tales como: Estados Unidos de América, República Checa,

Irán y Alemania.<sup>71,74,77 109</sup> Levan y *col.* en el 2001, reportaron que la presencia del genotipo CD14/-159TT disminuye la afinidad del factor transcripcional Sp1 (proteína de unión al promotor del gen *cd14*), lo cual ellos sugieren que incrementa la actividad transcripcional del gen *cd14* y se traduce en un aumento en la producción de CD14 soluble.<sup>65</sup> A pesar de lo reportado por Levan, nuestros resultados sugieren que no existe alguna influencia del genotipo sobre los niveles de CD14 tanto de membrana como soluble. Nuestros hallazgos están de acuerdo con los reportados por Pacheco y *col.* en el 2004<sup>103</sup>, ya que ellos no encontraron asociación entre los genotipos del SNP CD14/-159 y los niveles de CD14s. El genotipo TT del polimorfismo del promotor de CD14/-159 ha sido asociado con diferentes enfermedades de carácter infeccioso y no-infeccioso tales como: brucelosis en un población Iraní<sup>77</sup>, con la función pulmonar en granjeros de E.U.A.<sup>110</sup>, periodontitis crónica<sup>74</sup>, enfermedad de Crohn<sup>109</sup>, infección por *Chlamydia pneumoniae*<sup>111</sup>, entre otras. La frecuencia del genotipo CD14/-159TT fue alta en los pacientes con tuberculosis pulmonar (35.6%) cercana a la reportada en las enfermedades anteriormente mencionadas, especialmente con brucelosis (causada por un patógeno intracelular, similar a lo que pasa con tuberculosis). Los pacientes quienes presentaron el alelo T en el promotor del gene *cd14* tuvieron un riesgo mayor estadísticamente significativo de desarrollar tuberculosis pulmonar que aquellos que no lo presentaron. Lo anterior es apoyado por nuestros hallazgos encontrados en los contactos, donde el 50% de los contactos quienes desarrollaron tuberculosis pulmonar presentaron el alelo T. Contrario a nuestros resultados, Pacheco y *col.* en el 2004, reportaron que no existe una asociación

entre el polimorfismo en el promotor del gen *cd14* y la tuberculosis en una población Colombiana.<sup>103</sup>

Arbour y *col.* en el 2000, reportaron diversas mutaciones en el gen *tlr4*, principalmente Asp299Gly y Thr399Ile, dichas mutaciones demostraron estar involucradas en la hiporespuesta a endotoxinas.<sup>82</sup> Levan y *col.* en el 2005, no

encontraron una asociación entre el polimorfismo TLR4 Asp299Gly y la función pulmonar.<sup>110</sup> Raby y *col.* en el 2002, tampoco encontraron una relación entre el

polimorfismo TLR4/Asp299Gly y el asma.<sup>112</sup> Mockenhaupt y *col.* en el 2006, reportaron que dos SNPs en TLR4 (Asp299Gly y Thr399Ile) se encontraban en mayor frecuencia en niños Africanos con malaria severa (patógeno intracelular).<sup>95</sup> Rezazadeh y *col.* en el 2006, reportaron una alta frecuencia del

alelo G del polimorfismo en TLR4/Asp299Gly en pacientes con brucelosis y lo

relacionaron con el alto riesgo de desarrollar esa enfermedad.<sup>94</sup> Sin embargo,

de acuerdo con nuestros resultados y los de Newport y *col.* en el 2004, no se encontró una asociación entre el polimorfismo TLR4/Asp299Gly y la

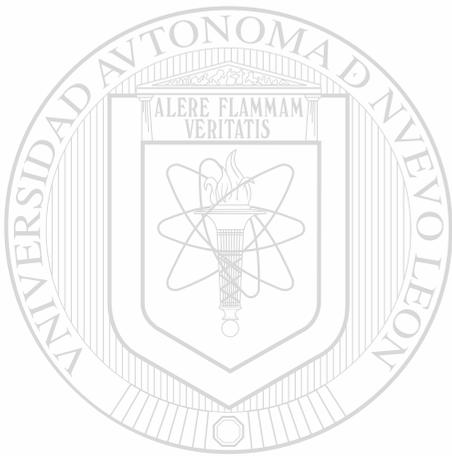
tuberculosis pulmonar.<sup>113</sup>

## CAPÍTULO X

### CONCLUSIONES

1. Los niveles de CD11c, CD14m/CD14s y TLR4 antes del tratamiento en los pacientes se encontraron elevados, pero después de 6-7 meses de iniciado el tratamiento, los niveles de estas moléculas disminuyeron a los encontrados en el grupo control. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que dichas moléculas pudieran servir como biomarcadores de pronóstico y en la respuesta al tratamiento en la tuberculosis pulmonar.
2. Las frecuencias de los polimorfismos en los genes de CD11c/T→C en la posición +48 del exón 2 y TLR4/Asp299Gly fueron muy similares en los grupos de estudio (90-96 % para ambos polimorfismos), por lo tanto se consideran que no son factores de riesgo o susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar.
3. El alelo T en la posición -159 del promotor de CD14 se encontró con una frecuencia significativamente mayor en los pacientes con tuberculosis pulmonar (60%) que en los controles (40%), lo cual sugiere que es un factor de riesgo para desarrollar tuberculosis pulmonar. Este resultado se corrobora por el hecho que este mismo alelo se encontró con una mayor frecuencia en los contactos quienes desarrollaron tuberculosis pulmonar (50%).

4. No se encontró diferencia entre los genotipos del polimorfismo en el promotor de CD14/-159 C→T y los niveles de CD14, tanto de membrana como soluble, lo cual indica que no está asociado con el incremento o disminución de estas moléculas.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO XI

### PERSPECTIVAS

- Buscar factores de transcripción relacionados con la regulación de la expresión de CD11c, CD14 y TLR4 durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

- Analizar los polimorfismos de otros genes candidatos como factores de riesgo o susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar tales como: el receptor de complemento-3, TLR-2, receptor de manosa, entre otros.
- Desarrollar un estudio prospectivo con pacientes recién diagnosticados

---

llevando a cabo mediciones mensuales de receptor de complemento tipo-3, TLR2 y receptor de manosa y corroborar su utilización como biomarcadores de una respuesta favorable del tratamiento.

- Buscar nuevos biomarcadores de pronóstico, resistencia o susceptibilidad implicados en el desarrollo de la tuberculosis pulmonar.

## CAPÍTULO XII

### REFERENCIAS

- 1.- Raviglione MC, Snider DE and Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis. *JAMA*. 1995. 273(3): 220-226.
- 2.- Guevara A, Juárez A, Zenteno R. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas tecnologías diagnósticas. *MEDUNAB*. 2003. 6(16): 46–51.
- 3.- Schluger NW and Rom WN. The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998. 157:679-691.
- 4.- Lennette EH, Balows A, Hasuler WJ, Truant JP. Microbiología clínica. México: Interamericana, 3 ed, 1983.
- 5.- Comstock GW. Epidemiology of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1982. 125(3 Pt 2):8-15.
- 6.- Aderem A and Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999, 17 : 593-623.
- 7.- Murray PJ. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections (Reviews). *Trends in Microbiol*. 1999. 7(9):366-372.
- 8.- Condos R, Rom WN, Liu YM and Schluger NW. Local Immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J. Respir Crit Care Med*. 1998. 157: 729-735.
- 9.- López-Hernández C. Efecto de *Mycobacterium tuberculosis* y sus fracciones en la producción de citocinas. U. A. Chiapas. Tesis de Licenciatura. 2001.

- 10.- Arce-Mendoza A, Arellano-Rangel G, Revol A, Rendón A, Salinas-Carmona M, Rosas-Taraco AG. Citocinas en lavado broncoalveolar de pacientes con tuberculosis. *Medicina Universitaria*. 2004. 6:88-95.
- 11.- Ferguson JS and Schlesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis*. 2000. 80: 173-184.
- 12.- Arnold RR, Rusell JE, Champion WJ, Brewer M, and Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. 1982. *Infect Immun*. 1982. 35:792-799.
- 13.- Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest*. 2002. 109:693-697.
- 14.- Lehrer RI and Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol*. 2002. 14:96-102.
- 15.- McCormack FX and Whitsett JA. The pulmonary collectins, SP-a and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest*. 2002. 109:707-712.
- 16.- Beharka AA, Gaynor CD, Kang BK, Voelker DR, McCormack FX, and Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein a up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol*. 2002. 169:3565-3573.
- 17.- Weikert LF, Lopez JP, Abdolrasulnia R, Chroneos ZC, and Sheperd VL. Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000. 279:L216-L223.

- 18.- Ansel KM, Harris RB, and Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*. 2002. 16:67-76.
- 19.- Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* and the complement system. *Trends Microbiol*. 1998. 6:47-49.
- 20.- Ernst, J. D. MINIREVIEW: Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immunit*. 1998. 66 (4): 1277 – 1281.
- 21.- Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003. 197:121-127.
- 22.- Schorey, J. S., M. C. Carroll, E. J. Brown. A Macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*. 1997. 277:1091-1093.
- 23.- Leemans JC, Florquin S, Heikens M, Pals ST, van der Neut R, van der Poll T. CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest* 2003; 111:681-689.
- 24.- van Crevel R, Ottenhoff TH, and Der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002. 15:294-309.
- 25.- Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F, Ryffel B. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol*. 2002. 169(6):3155-62.
- 26.- Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S. Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in

- resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2002. 169(7):3480-4.
- 27.- Bellamy R. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. *Thorax* 1998. 53:588-593.
- 28.- Abel L and Casanova JL. Chapter 26 "Immunogenetics of the host response to bacteria and parasites in humans" *In Immunology of Infectious Diseases*. 2002. ASM Press, Washington, D.C. 395-406.
- 29.- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, and Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Ann. Rev Immunol*. 2005. 23:901-944.
- 30.- Knapp W, Dorken B, Rieber. 1989. Leucocyte Typing IV: White Cell differentiation antigens. Oxford University Press, New York.
- 31.- Stacker SA and Springer TA. Leukocyte integrin P150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter receptor on stimulated epithelium. *J Immunol*. 1991. 146:648-655.
- 32.- Zaffran Y, Zhang L, and Ellner JJ. Role of CR4 in *Mycobacterium tuberculosis*-Human macrophages binding and signal traduction in the absence of serum. *Infect Immun*. 1998. 66(9):4541-4544.
- 33.- Rosas-Taraco AG, Arce-Mendoza AY, Caballero-Olín G, Salinas-Carmona MC. *Mycobacterium tuberculosis* up-regulate coreceptors CCR5 and CXCR4 while HIV modulate CD14 favoring concurrent infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2006. 22(1): 45-51.

- 34.- Arce-Mendoza A, Rosas-Taraco AG, Salinas-Carmona MC, Orozco-Salas C. Modulación de la expresión de receptores empleados por micobacterias en leucocitos por *Mycobacterium tuberculosis* y sus fracciones. *RESPyN*. 2004. 6(2).
- 35.- Frenzel H, Hampe J, Huse K, Mascheretti SM, Croucher PP, Lynch NJ, Siebert R, Platzer M, Schreiber S. Mutation detection and physical mapping of the CD11 gene cluster in association with inflammatory bowel disease. *Immunogenetics*. 2002. 53(10-11):835-42.
- 36.- Noti JD, Reinemann BC, and Petrus MN. Sp1 binds two sites in the CD11c promoter *in vivo* specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription. *Molec Cell Biol*. 1996. 16(6):2940-2950.
- 37.- Noti JD. Sp3 mediates transcriptional activation of the leukocyte integrin genes CD11c and CD11b and cooperates with c-Jun to activate CD11c. *J Biol Chem*. 1997. 272(38):24038-24045.
- 38.- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ITGAX&search=CD11c>
- 39.- Hellmin S, Mascheretti S, Renz J, Frenzel H, Jelschen F, Renhein JK, Fölsch U, Hampe J, and Schreiber S. Haplotype analysis of the CD11 gene cluster in patients with chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric ulcer disease. *Tissue Antigens*. 2005. 65:271-274.
- 40.- Bazil V, Baudys M, Hilgert I, Stefanova I, Low M, Brozek J, Horejsi V. Structural relationship between the soluble and membrane bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol Immunol*. 1989. 26:657-662.
- 41.- Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993. 14:121-125.

- 42.- Pugin J, Schrer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) activation of human endothelial and epithelial cell is mediated by LPS binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90:2744-2748.
- 43.- Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1992. 176:1665-1671.
- 44.- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein (comment). *Science*. 1990. 249:1431-1433.
- 45.- Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1995. 13:437-57.
- 46.- Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidyl-inositol linkage. *J Immunol*. 1988. 141:547-552.
- 47.- Bazil V, Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol*. 1991. 147:1567-1574.
- 48.- Metz CN, Brunner G, Choi-Muir NH, Nguyen H, Gabilove J, Caras IW, Altszuler N, Rifkin DB, Wilson EL, Davitz MA. Release of GPI-anchored membrane protein by a cell-associated GPI-specific phospholipase D. *EMBO J*. 1994. 13:1741-1751.

- 49.- Senft AP, Korfhagen TR, Whitsett JA, Shapiro SD, and LeVine AM. Surfactant protein D regulates soluble CD14 through matrix metalloproteinase-12. *J Immunol.* 2005. 174:4953-4959
- 50.- Pang Z, Zhou L, Hetherington CJ, Zhang D. Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *J Biol Chem.* 2000. 275: 36430–36435.
- 51.- Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, and Gabay C. CD14 is an acute – phase protein. *J Immunol.* 2004. 172: 4470-4479.
- 52.- Landmann R., Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, Calandra T. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in Gram-negative shock. *J Infect Dis.* 1995.171:639-644.
- 52.- Takeshita S, Nakatani K, Tsujimoto H, Kawamura Y, Kawase H, Sekine I. Increased levels of circulating soluble CD14 in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2000. 119:376-381.
- 53.- Wuthrich B, Kagi MK, Joller-Jemelka H. Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1992; 284:339-342.
- 54.- Oesterreicher C, Pfeffel F, Petermann D, Muller C. Increased in vitro production and serum levels of the soluble lipopolysaccharide receptor sCD14 in liver disease. *J Hepatol.* 1995. 23:396-402.
- 55.- Horneff G, Sack U, Kalden JR, Emmrich F, Burmester GR. Reduction of monocyte-macrophage activation markers upon anti-CD4 treatment: decreased levels of IL-1, IL-6, neopterin and soluble CD14 in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1993. 91:207-213.

- 56.- Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dorner T. Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000. 9:614-621.
- 57.- Ayaslioglu E, Tekeli E, Birengel S. Significant Elevation of Serum Soluble CD14 Levels in Patients with Brucellosis. *Jpn J Infect Dis*. 2005. 58:11-14.
- 58.- Hoheisel G, Zheng L, Teschler H, Striz I, Costabel U. Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest*. 1995.108:1614–1616.
- 59.- Peterson P, Gekker G, Hu S, Sheng W, Anderson W, Ulevitch R, Tobias P, Gustafson K, Molitor T, and Chao C. CD14 Receptor-Mediated Uptake of Nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by Human Microglia. *Infect Immun*. 1995. 63(4): 1598-1602.
- 60.- Roach, T. I., C. Howard Barton, D. Chatterjee, and J. M. Blackwell. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and Tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol*. 1993. 150: 1886-1896.
- 61.- Schlesinger, L. S., S. Hull, and T. Kaufman. Binding of Terminal Mannosyl Units of Lipoarabinomannan from a Virulent Strain of *Mycobacterium tuberculosis* to Human Macrophages. *J Immunol*. 152: 4070-4079.
- 62.- Bernardo, J., A. Billingslea, R. Blumenthal, K. Seetoo, E. Simons, and M. Fenton. Differential Responses of Human Mononuclear Phagocytes to Mycobacterial Lipoarabinomannans: Role of CD14 and the Mannose Receptor. *Infect Immun*. 1998. 66(1): 28-35.

- 63.- Medvedev, A. E., T. Flo, R. R. Ingalls, D. T. Golenbock, G. Teti, S. N. Vogel, and T. Espevik. Involvement of CD14 and Complement receptors CR3 and CR4 in Nuclear Factor- $\kappa$ B activation and TNF production induced by lipopolysaccharide and group B Streptococcal cell walls. *J Immunol*. 1998. 160:4535-4542.
- 64.- Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, LeBeau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science*. 1988. 239:497-500.
- 65.- Levan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* 2001;167:5838-44.
- 66.- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD14&search=CD14>
- 67.- Hubacek JA, Rothe G, Pit'ha J, Skodova Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G. C(-260)-->T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*. 1999. 99(25):3218-20.
- 68.- Zee RY, Lindpaintner K, Struk B, Hennekens CH, Ridker PM. A prospective evaluation of the CD14 C(-260)T gene polymorphism and the risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001. 154(3):699-702.
- 69.- Zee RY, Bates D, Ridker PM. A prospective evaluation of the CD14 and CD18 gene polymorphisms and risk of stroke. *Stroke*. 2002. 33(4):892-5.
- 70.- Yoon HJ, Shin JH, Yang SH, Chae DW, Kim H, Lee DS, Kim HL, Kim S, Lee JS, Kim YS. Association of the CD14 gene -159C polymorphism with progression of IgA nephropathy. *J Med Genet*. 2003. 40(2):104-8.

- 71.- Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999. 20(5):976-83.
- 72.- Karhukorpi J, Yan Y, Niemela S, Valtonen J, Koistinen P, Joensuu T, Saikku P, Karttunen R. Effect of CD14 promoter polymorphism and *H. pylori* infection and its clinical outcomes on circulating CD14. *Clin Exp Immunol.* 2002. 128(2):326-32.
- 73.- Hubacek JA, Stavek P, Pit'ha J, Skodova Z, Poledne R. CD14 (C-159-->T) polymorphism and levels of C-reactive protein. *Cas Lek Cesk.* 2003. 142(3):174-6.
- 74.- Holla LI, Buckova D, Fassmann A, Halabala T, Vasku A, Vacha J. Promoter polymorphisms in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. *J Med Genet.* 2002. 39(11):844-8.
- 75.- Unkelbach K, Gardemann A, Kostrzewa M, Philipp M, Tillmanns H, Haberbosch W. A New Promoter Polymorphism in the Gene of Lipopolysaccharide Receptor CD14 Is Associated With Expired Myocardial Infarction in Patients With Low Atherosclerotic Risk Profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999.19:932-938.
- 76.- Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, and Epplen JT. A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol.* 2002.37:189-91.

- 77.- Haidari M, Hajilooi M, Rezazadeh M, Rafiei A, Alavi SA, and Keramat F. Polymorphism in the promoter region of the CD14 gene and susceptibility to brucellosis. *Immunolog Invest.* 2006.35:239-245.
- 78.- Janssens S, Beyaert R. Role of Toll like Receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003. 16(4):637-646.
- 79.- Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowsky MT, Lawless D, and Steinman RM. *J. Exp. Med.* 1990. 171:1753-1771.
- 80.- Takeda K, S Akira. Roles Toll-like receptors in innate immune response. *Genes to Cells.* 2001. 6:733-742.
- 81.- Takeda K, S Akira. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiol.* 2003. 5:143-153.
- 82.- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000. 25(2):187-91.
- 83.- Janssens S and Beyaert. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003. 16(4):637-646.
- 84.- Akira S. Toll like receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003. 278:38105-38108
- 85.- Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenboc DT, Fenton MJ. Human Toll-Like Receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999. 163: 3920-3927.

- 86.- Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, Arditi M. *Mycobacterium tuberculosis* Heat Shock Proteins use diverse Toll-like Receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J Biol Chem.* 2005. 280: 20961-20967.
- 87.- Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJF, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F, Ryffel B. Toll-Like Receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. *J Immunol.* 2002.169: 3155-3162.
- 88.- Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, Renaud Y, Faith J, Lemire M, Greenwood C, Weiland KM, Lange C, Palmer LJ, Lazarus R, Vercelli D, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez FD, Hudson TJ, Weiss ST. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002. 166:1449-1456.
- 89.- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR4&search=TLR4>
- 90.- Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, Lamotte M, Lebreton D, Ollivier V, de Prost D. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. 23(12):e61-4.
- 91.- Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis.* 2002. 186(10):1522-5.
- 92.- Rudofsky G Jr, Reismann P, Witte S, Humpert PM, Isermann B, Chavakis T, Tafel J, Nosikov VV, Hamann A, Nawroth P, Bierhaus A. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of

diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004. 27:179-183.

93.- Franchimont D, Vermeire S, Housni HE, Pierik M, Steen KV, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Gossum AV, Devière J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 2004.53:987-992.

94.- Rezazadeh M, Hajilooi M, Rafiei A, Haidari M, Nikoopour E, Kerammat F, Mamani M, Ranjbar M, Hashemi H. TLR4 polymorphism in Iranian patients with brucellosis. *J Infect*. 2006. 53:206.

95.- Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh N, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schröder NWJ, Bienzle U, Schumann RR.

---

Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *PNAS*. 2006.103:177-182.

96.- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2001. Third Edition. Tome III. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

97.- Bashar M, Alcabes P, Rom W and Condos R. Increased incidence of multidrug-resistant tuberculosis in diabetic patients on the Bellevue chest service 1987 to 1997. *Clinical Investigations*. 2001. (120)5:1514-1519.

98.- Hill A. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol*. 1998. 16:593-617.

- 99.- Casanova JL and Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: The Human model. *Annu Rev Immunol.* 2002. 20: 581-620.
- 100.- Stent G, Cameron PU, and Crowe SM. Expression of CD11/CD18 and ICAM-1 on monocytes and lymphocytes of HIV-1-infected individuals. 1994. *J Leukoc Biol.* 56(3):304-309.
- 101.- Brunialti MKC, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R. TLR2, TLR4, CD14, CD11b, and CD11c expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock.* 2006.25:351-357.
- 102.- Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJH, Buurman WA, Deutekom H, Speelman P, van der Poll T. Serum Concentrations of Lipopolysaccharide activity-modulating proteins during Tuberculosis. *J Infec Dis.* 1998.178:1839-1842.
- 
- 103.- Pacheco E, Fonseca C, Montes C, Zabaleta J, Garcia LF, Arias MA. CD14 gene promoter polymorphism in different clinical forms of tuberculosis. *Immunol Med Microbiol.* 2004.207-213.
- 104.- Striz I, Zheng L, Wang YM, Pokorna H, Bauer PC, Costabel U. Soluble CD14 is increased in bronchoalveolar lavage of active sarcoidosis and correlates with alveolar macrophage membrane-bound CD14. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995.151:544-547.
- 105.- Lien E, Aukrust P, Sundan A, Müller F, Froland SS, Espevik T. Elevated levels of serum-soluble CD14 in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) infection:

Correlation to disease progression and clinical events. *Blood*. 1998. 92:2084-2092.

106.- Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 1994. 96:15-9.

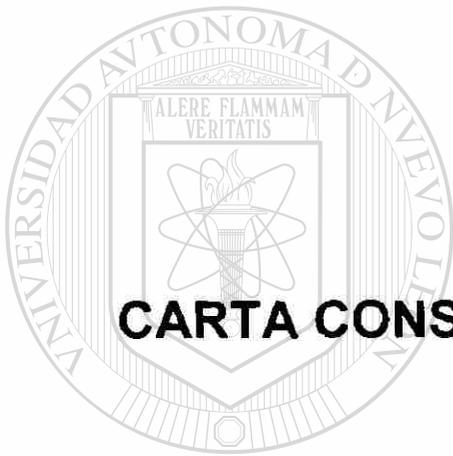
107.- Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to Lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2004. 72:1223-1229.

108.- Riordan SM, Skinner NA, Kurtovic J, Locarnini S, McIver CJ, Williams R, Visvanathan K. Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: Correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflamm Res*. 2006. 55:279-85.

109.- Griga T, Klein W, Epplen JT, Hebler U, Stachon A, May B. CD14 expression on monocytes and soluble CD14 plasma levels in correlation to the promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene in patients with inactive Crohn's disease. *Hepatogastroenterology*. 2005.52:808-11.

110.- Levan TD, Von Essen S, Romberger DJ, Lambert GP, Martinez FD, Vasquez MM, Merchant JA. Polymorphisms in the CD14 gene associated with pulmonary function in farmers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005.171:773-779.

- 111.- Rupp J, Goepel W, Kramme E, Jahn J, Solbach W, Maass M. CD14 promoter polymorphism -159C>T is associated with susceptibility to chronic *Chlamydia pneumoniae* infection in peripheral blood monocytes. *Genes Immun.* 2004;5:435-8.
- 112.- Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, Renaud Y, Faith J, Lemire M, Greenwood C, Weiland KM, Lange C, Palmer LJ, Lazarus R, Vercelli D, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez FD, Hudson TJ, Weiss ST. Polymorphisms in Toll-Like Receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1449-1456.
- 113.- Newport MJ, Allen A, Awomoyi AA, Dunstan SJ, McKinney E, Marchant A, Sirugo G. The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in The Gambia. *Tuberculosis* 2004; 84:347-352.



## **ANEXO I**

# **CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### PROYECTO:

#### **"Asociación del patrón y polimorfismos de CD11c, CD14 y TLR4 con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar"**

Se me ha invitado a participar en el estudio anteriormente mencionado como paciente, contacto o sujeto control clínicamente sano. Estoy informado(a) que se me aplicará la prueba de PPD (Mantux), así como también, se me realizará una toma de muestra de sangre venosa periférica (2 en el caso de ser paciente), dichas muestras se utilizarán para la realización de estudios de investigación en los que se buscará la asociación de patrones de expresión de receptores empleados por *M. tuberculosis* y sus polimorfismos con la susceptibilidad a contraer tuberculosis pulmonar. Los resultados obtenidos serán manejados en forma confidencial y en ningún momento se violará mi privacidad. Entiendo que mi participación en esta investigación no implica ningún riesgo para mi salud. Entiendo también que el análisis de mis muestras durante este estudio no implicará ningún costo para mí y que los gastos serán cubiertos por los investigadores.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. En caso de que tenga cualquier duda o pregunta me puedo dirigir al Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza al teléfono 83 29 42 11. Además entiendo que estoy en la libertad de retirarme en el momento que desee.

---

VOLUNTARIO

---

TESTIGO

NOMBRE:

NOMBRE:

DIRECCION:

DIRECCION:



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TESTIGO

INVESTIGADOR



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMBRE

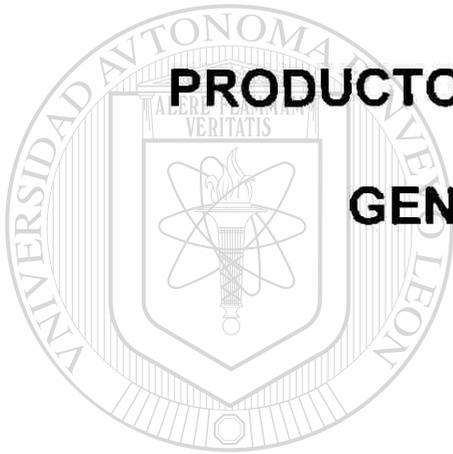
NOMBRE:

DIRECCION:

DIRECCION:

## **ANEXO II**

### **CONDICIONES DE DIGESTIONES DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LOS GENES AMPLIFICADOS**



**UANL**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Reacciones de las digestiones de los productos amplificados de los genes:**

Se estandarizaron las condiciones óptimas para las digestiones para la detección de cada polimorfismo estudiado.

**Reacciones de digestión para la detección del SNP en CD11c**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (µl)</b>
<b>Producto amplificado</b>	<b>10.0</b>
<b>Amortiguador</b>	<b>2.0 (1X)</b>
<b>Enzima Nci I</b>	<b>0.1 (1 U)</b>
<b>Albúmina sérica bovina (ASB)</b>	<b>0.2 (1X)</b>
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	<b>7.7</b>

**Volumen final** **20.0**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### Reacciones de digestión para la detección del SNP en CD14

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
Producto amplificado	10.0
Amortiguador	2.0 (1X)
Enzima <i>Ava</i> II	0.1 (0.5 U)
Albúmina sérica bovina (ASB)	0.2 (1X)
H <sub>2</sub> O miliQ	7.7
<b>Volumen final</b>	<b>20.0</b>

### Reacciones de digestión para la detección del SNP en TLR4

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
Producto amplificado	10.0
Amortiguador	2.0 (1X)
Enzima <i>Nco</i> I	0.1 (0.5 U)
Albúmina sérica bovina (ASB)	0.2 (1X)
H <sub>2</sub> O miliQ	7.7
<b>Volumen final</b>	<b>20.0</b>

## **Resumen Curricular y Producción científica**

**Nombre:** Adrián Geovanni Rosas Taraco.

**Fecha de Nacimiento:** 28 de Junio de 1978.

**Nacionalidad:** Mexicana.

**Estado Civil:** Casado.

**e-mail:** adrian\_rota@yahoo.com

**Licenciatura:** UANL, Facultad de Ciencias Biológicas: Carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. 1995 – 2000.

**Maestría:** UANL, Facultad de Medicina. Maestría con Esp. en Inmunología. 2000-2002.

50 trabajos de investigación presentados en Congresos, Simposiums o Foros Nacional e Internacionales.

---

13 Conferencias impartidas Congresos, Simposiums o Foros Nacional e Internacionales.

3 Publicaciones en Revistas Nacionales e Internacionales Indexadas y de arbitraje.

14 Premios en Investigación Biomédica y 1 Patente en Trámite.

Reconocimientos al Mérito Académico a lo largo de la licenciatura.

*Reconocimiento como mejor Estudiante de Doctorado con Orientación en Inmunología 2006.*

Premio Estatal de la Juventud 2006 en el Área de Actividades Académicas.

Miembro de la Sociedad Mexicana de Inmunología, de la American Society for Microbiology y la Sociedad Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica.

### **Producción científica de la tesis**

1 Patente en trámite

5 Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales

- Congreso Nacional de Investigación Biomédicas. Monterrey NL, Mex. 2005.

- Congreso Nacional de los Profesionales de la Químicos Clínicos y ExpoLab Tampico. Tampico Tamps, Mex. 2006.

- Congreso Nacional de Inmunología. Chihuahua Ch, Mex. 2006

- 106th Meeting of American Society for Microbiology. Orlando FL, EUA. 2006.

- Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. Monterrey NL, Mex. 2006.

2 Premios de Investigación

- Premio de Investigación Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla.
- Premio de Investigación Clínica Dr. Gerard Domaghk.

1 Artículo enviado a publicación al American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, titulado "CD14 (C-159T) Polymorphism is a Risk Factor for Development of Pulmonary Tuberculosis".

1 Artículo en escritura, el cual será enviado a publicación a Journal Infectious Diseases.

