UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ASOCIACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD HLA-DR Y –DQ Y LA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS PULMONAR EN POBLACIÓN DERECHOHABIENTE DEL I.M.S.S., NUEVO LEÓN.

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Especialidad: Biología Celular y Genética)

Presenta

M. en C. MARÍA DE LOS ANGELES ROJAS ALVARADO

Monterrey, N. L., Noviembre del 2005.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ASOCIACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD HLA-DR Y LA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS PULMONAR EN POBLACIÓN DERECHOHABIENTE DEL I.M.S.S., NUEVO LEÓN.

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Especialidad: Biología Celular y Genética)

presenta

M. en C. MARÍA DE LOS ANGELES ROJAS ALVARADO

COMISIÓN DE TESIS:

Presidente.

Dr. Salvador L. Said y Fernández.

Secretario.

Dr. Rahim Foroughbackhch P.

Vocal I.

Dra. Julia Verde Star.

Vocal II.

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.

Vocal III.

Dr. Mario Morales Vallarta.

Monterrey, N. L., Noviembre del 2005.

DEDICATORIA

A mis padres:
Eugenio Rojas Granja (†)
Ma. Del Pilar Alvarado de Rojas
Con amor.

A mis hermanos:
Juany, Eugenio, Paulino, Toña,
Jesús, Kena, Mily, Magda y Francisco.
Agradezco a la Vida su presencia a través del tiempo.

A mis hermanos políticos y sobrinos
Que son y han sido parte del tesoro de mi vida.

A mis amigas y amigos
que han confiado en mí
Con agradecimiento y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Salvador Said Fernández, Director del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, por su apoyo y por aceptar ser el director de esta tesis.

A los integrantes de mi comité de tesis: Dr. Rahim Foroughbackhch P., Dra. Julia Verde Star, Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y Dr. Mario Morales Vallarta. Con respeto y admiración.

Al Dr. Ricardo M. Cerda Flores, Jefe de la División de Genética del CIBIN, por haberme brindado desinteresadamente su asesoría, la cual fue fundamental para el desarrollo del presente trabajo, gracias por su invaluable apoyo.

Al Dr. Raúl Garza Chapa, Ex-Jefe de la División de Genética del CIBIN por haberme permitido trabajar en el campo de la investigación.

Al Dr. Guillermo Caballero Olín, Médico Epidemiólogo de la UMF No. 28 del IMSS, por su valiosa colaboración en la canalización de los pacientes para su participación en este estudio. Con respeto y admiración por su entrega profesional, en particular al combate contra la tuberculosis.

Al Dr. Salvador Baldovinos Chávez, ex-Jefe de la Subdirección de Investigación Biomédica del IMSS, por su invaluable apoyo para el desarrollo del trabajo de campo y de laboratorio de esta tesis.

A la M. en C. María Luisa Mendoza Díaz, encargada de la sección de estudios de Histocompatibilidad del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Especialidades No. 25 del IMSS, por su asesoría en el trabajo de laboratorio para la determinación de los antígenos HLA. Gracias también por su amistad.

A la Q.F.B. Leticia Navarro Marmolejo y M. en C. Pola Becerril Montes, por su participación en la confirmación del diagnóstico de los pacientes por medio del cultivo de *M. tuberculosis*. Gracias por su compañerismo y amistad.

Al M. en C. Carlos H. Leal Garza, por su apoyo para esta tesis, durante el tiempo que fungió como Jefe de la División de Genética del CIBIN.

A las Dras. Martha I. Dávila García y Elva I. Cortés Gutiérrez, por su compañerismo y amistad.

Al Dr. Jorge Castro Garza, M. en C. Miguel A. Zúñiga Charles y la Q.F.B. Lorena Siller Campos, por su ayuda con sus valiosos comentarios y sugerencias de referencias bibliográficas para esta tesis.

A todos mis ex-compañeros del CIBIN, de quienes conservo un bello recuerdo y quienes con su compañerismo y amistad hicieron grata mi estancia y trabajo en el CIBIN.

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO

EN LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES:

Instituto Mexicano del Seguro Social:
Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN),
División de Biología Celular. Laboratorio de Micobacteriología.
División de Genética, Departamento de Genética de Poblaciones.
2 de Abril y San Luis Potosí, Col. Independencia, Monterrey, N. L.

Instituto Mexicano del Seguro Social:
Unidad de Medicina Familiar No. 28.
Departamento de Medicina Preventiva.
Ave. Penitenciaría y Ave. Fidel Velázquez, Monterrey, N. L.

Instituto Mexicano del Seguro Social:
Hospital de Altas Especialidades No. 25.
Laboratorio de Análisis Clínicos, sección de estudios de Histocompatibilidad.
Ave. Lincoln y Ave. Gonzalitos, Monterrey, N. L.

Universidad Autónoma de Nuevo León:
Facultad de Medicina.
Departamento de Bioquímica.
Ave. Madero Esq. Dr. Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, Monterrey, N. L.

Universidad Autónoma de Nuevo León:
Facultad de Ciencias Biológicas.
Departamento de Botánica
División de Estudios de Postgrado
Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L.

ÍNDICE

RESUMEN i

ABSTRACT ii

I. INTRODUCCIÓN 1

II. ANTECEDENTES 4

2.1 Tuberculosis pulmonar 4

2.1.1 Definición 4

2.1.2 Historia natural de la tuberculosis pulmonar 4

2.1.3 Epidemiología de la tuberculosis pulmonar 7

2.1.4 Diagnóstico Clínico de la tuberculosis pulmonar 9

2.1.5 Tratamiento 10

2.1.6 Susceptibilidad y resistencia naturales a la tuberculosis pulmonar 10

2.2 Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) 12

2.2.1 Asociación HLA-enfermedad 18

2.2.2 Asociación HLA-tuberculosis 20

2.2.3 Tipificación de los antígenos HLA 24

2.3 Antecedentes genéticos de la población del Área Metropolitana de Monterrey (AMM) 27

2.4 Tuberculosis en la población de la Unidad de Medicina Familiar (UMF) No. 28 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) 27

HIPÓTESIS 30

OBJETIVOS 31

III. MATERIAL Y MÉTODOS 32

3.1 Selección de la población y el diseño experimental 32

3.1.1 Grupo de enfermos de tuberculosis pulmonar 32

3.1.1.1 Criterios de inclusión 32

3.1.1.2 Criterios de exclusión 33

3.1.2 Grupo de testigos sanos 33

3.2 Análisis de laboratorio 34

3.2.1 Cultivo de micobacterias 34

3.2.2 Tipificación para los antígenos HLA clase II 34

3.2.2.1 Aislamiento de linfocitos B. Técnica de perlas Inmunomagnéticas 35

3.2.2.2 Técnica de microlinfocitotoxicidad dependiente de Complemento 36

3.3 Análisis estadístico de la información 39

IV. RESULTADOS 40

V. DISCUSIÓN 46

VI. IMPLICACIONES Y PERSPECTIVAS 49

VII. CONCLUSIONES 50

ANEXO 1. Diagrama de flujo 51

ANEXO 2. Publicaciones 52

BIBLIOGRAFÍA 53

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figuras

1.- Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano. 13

2.- Moléculas HLA clase I. 14

3.- Moléculas HLA clase II. 16

4.- Representación de la coloración de linfocitos B en reacción positiva (roja) y negativa (verde), marcados con naranja de acridina y bromuro de etidio, observada al microscopio de fluorescencia. 26

Cuadros

1.- Asociación de TbP con algunos antígenos HLA-DR y –DQ y haplotipos HLA-DR/-DQ en diferentes poblaciones del mundo. 23

2.- Lectura estándar establecida por la ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics). 38

3.- Descripción de la población de enfermos con tuberculosis pulmonar. Factores sociodemográficos. 40

4.- Distribución de edades del grupo pacientes con tuberculosis pulmonar. 41

5.- Descripción de la población de enfermos con tuberculosis pulmonar. Factores fisiopatológicos. 42

6.- Frecuencias génicas estimadas para los loci HLA-DR y –DQ en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos. 43

7.- Frecuencias alélicas estimadas para el locus HLA-DR (con diferencia significativa) en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos. 43

8.- Frecuencias alélicas estimadas para el locus HLA-DQ (con diferencia significativa) en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos. 44

9.- Frecuencias haplotípicas HLA-DR/-DQ estimadas (con diferencia significativa) en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos. 45

RESUMEN

La susceptibilidad genética a TbP se ha asociado a algunos genes candidatos y a los antígenos del sistema HLA (Antígenos de los Leucocitos Humanos) del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. La población de la UMF No. 28 del IMSS tiene una alta incidencia de tuberculosis pulmonar (TbP). Se planteó la siguiente hipótesis: en la población de la UMF No. 28 existe asociación entre la susceptibilidad a TbP y la presencia de antígenos HLA-DR y -DQ. El objetivo fue determinar la asociación entre los antígenos HLA-DR y -DQ con TbP en población del IMSS. Los fenotipos HLA de los grupos "enfermos con tuberculosis" (n=50; E) y "testigos sanos" (n=417; TS), fueron definidos serológicamente por la prueba de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento. El análisis de la estructura genética se llevó a cabo por medio del programa Arlequín versión 2.0. e incluyó: 1) la prueba exacta del equilibrio de Hardy-Weinberg, 2) la prueba de desequilibrio de ligamiento, 3) el algoritmo maximizado de expectación para haplotipos y distancias genéticas (F_{ST} por pares). Para determinar el riesgo relativo se utilizó el programa Episode, el nivel de significancia fue <0.05. Resultados: 1) en el grupo E, se encontraron incrementados los alelos HLA-DR11(5), -DR16(2), y –DQ7(3) y los haplotipos HLA: /DR11(5)-DQ7(3), /DR14(6)-DQ5(1), /DR16(2)-DQ5(1), /DR16(2)-DQ6(1), /DR16(2)-DQ7(3), y /DR4-DQ4, 2) en el grupo TS, se encontraron incrementados los alelos HLA-DR17(3) y DQ8, y el haplotipo /DR4-DQ8, y 3) Un valor de F_{ST} de 0.01152 (P = 0.00901). Los alelos y haplotipos incrementados en ambos grupos sugieren: a) en el grupo E una posible asociación positiva de antígenos HLA con TbP y por tanto, una alta susceptibilidad a TbP, b) en el grupo TS una posible asociación negativa o protección contra TbP, c) el valor de F_{ST} indica que ambas poblaciones tienen diferente estructura genética. Con el banco de DNA formado, se pretende ampliar este estudio en búsqueda de los alelos y haplotipos asociados a TbP a nivel molecular y posibles genes candidatos tanto a susceptibilidad como a resistencia a TbP.

ABSTRACT

The genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis (PTb) has been associated to several candidate genes and to the HLA (human leukocyte antigen) system of the MHC (major histocompatibility complex). Population from UMF number 28 of the IMSS has a high incidence of PTb. It was considered the following hypothesis: in the population of UMF number 28, association between the susceptibility to PTb and the presence of antigens HLA-DR and - DQ exists. The aim of this study was to determine the association between antigens HLA-DR and -DQ with PTb in population from the IMSS. Phenotypes HLA from the population "with tuberculosis" (n=50; E) and "healthy controls" (n=417; TS), were defined serologically by complement dependent microlymphocytotoxic assay. The genetic structure was determined by Arlequin version 2.0 computer program. The analysis included: 1) the exact test of Hardy-Weinberg equilibrium, 2) linkage disequilibria test and 3) the maximized algorithm of expectation for haplotypes and genetic distance (FST by pairs). Episode program was used to determine the relative risk. The significance level was <0.05. Results: 1) in E group, alleles HLA-DR11(5), -DR16(2), and –DQ7(3), and haplotypes HLA: /DR11(5)-DQ7(3), /DR14(6)-DQ5(1), /DR16(2)-DQ5(1), /DR16(2)-DQ6(1), /DR16(2)-DQ7(3), and /DR4-DQ4, were increased, 2) in TS group alleles HLA-DR17(3) and DQ8, and the haplotype /DR4-DQ8, were increased, and 3) A F_{ST} value of 0.01152 (P = 0.00901). Alleles and haplotypes increased in both groups suggest: a) for the E group, a possible positive association of HLA antigens with PTb and therefore, a high susceptibility to PTb in this group, b) for the TS group, a possible negative association or protection against PTb, c) the F_{ST} value indicates that both populations have different genetic structure. With the formed bank of DNA, it is tried to extend this study in searching for both, the alleles and haplotypes associated to PTb at molecular level, and possible candidate genes to susceptibility and to resistance to PTb.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infecciosa multifactorial causada principalmente por especies que conforman el complejo tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis, M. africanum* y *M. microti*. Es altamente incapacitante y contagiosa. De acuerdo con Mandell et al. (1991), se ha estimado que cada paciente bacilífero es capaz de infectar en el lapso de dos años a otras 10 ó 20 personas. Por otro lado, con la creciente epidemia de SIDA, enfermedad que contribuye a una diseminación más rápida de la tuberculosis en algunas comunidades (WHO, 1996), ésta se convierte en un problema de salud más grande para nuestra comunidad.

A partir de 1985, la incidencia de tuberculosis pulmonar ha aumentado considerablemente en los países industrializados. La OMS ha considerado a la tuberculosis como una enfermedad infecciosa emergente. En nuestro país, se han presentado tasas más altas de mortalidad por TbP desde 1975, año en que fue una de las diez más altas en el mundo.

A nivel local, la población del Área Metropolitana de Monterrey (AMM) también se ha visto afectada por este problema de salud. La situación de la población de la UMF No. 28, ubicada en el noroeste del AMM, con respecto a la tuberculosis pulmonar es ciertamente importante, ya que sólo el 28.30% de los pacientes que recibieron tratamiento acortado fueron egresados por curación dentro de los primeros seis meses de tratamiento. Por otro lado, el 11% de los pacientes que sí se curan, presentan recaídas en un período inferior a 12 meses.

Los antígenos HLA-DR y -DQ han sido asociados a susceptibilidad a tuberculosis pulmonar. La frecuencia de estos antígenos puede variar de una población a otra; esto posiblemente se debe a diferencias en su estructura genética. Por esto, los estudios de asociación de los antígenos HLA con la

susceptibilidad a tuberculosis pulmonar deben ser efectuados en varias poblaciones del mundo.

Existe muy escasa información sobre la asociación de los antígenos HLA con tuberculosis pulmonar en población mexicana, sólo una de las investigaciones se llevó a cabo tomando en cuenta los antígenos HLA clase II (Terán-Escandón, 1999). En particular, en la población del AMM no se ha realizado este tipo de estudios.

Algunos o todos los antígenos HLA-DR y -DQ que han sido asociados con la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar activa en otras poblaciones, podrían estar presentes en una alta frecuencia en la población con tuberculosis pulmonar que acude a consulta en la UMF No. 28. Mediante este trabajo será posible corroborar la asociación de estos antígenos con la tuberculosis pulmonar en nuestra población.

Una vez definida dicha asociación, sería posible establecer más apropiadamente una terapia antifímica individual en aquellos portadores de antígenos HLA asociados a una alta susceptibilidad a tuberculosis.

Con estos datos también se podría establecer mejor el pronóstico sobre el curso de la enfermedad en los pacientes bajo tratamiento antifímico. La detección de marcadores de susceptibilidad a tuberculosis pulmonar sería útil en la Medicina Preventiva de la tuberculosis. Permitiría identificar a personas sanas positivas para antígenos HLA asociados a una alta susceptibilidad, sobre todo en los contactos familiares, quienes están en alto riesgo de contraer la enfermedad y así tomar las medidas preventivas apropiadas para evitar el contagio.

En el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, se integró un equipo multidisciplinario para el estudio de la tuberculosis, bajo la dirección del Dr. Salvador Said Fernández. Se diseñó un megaproyecto en el que se ha

contemplado estudiar la problemática de la tuberculosis de una manera integral para un mejor conocimiento de su fisiopatología y epidemiología.

Este trabajo contribuye a un mayor conocimiento de la fisiopatología de la tuberculosis y por lo tanto, a una mayor posibilidad de control epidemiológico de la misma, en beneficio de los pacientes con TbP y del IMSS y de los institutos de salud para reducir el costo social y económico que representa esta enfermedad.

El presente trabajo forma parte del mencionado proyecto. Se llevó a cabo en la Unidad de Medicina Familiar No. 28 del IMSS, cuya población derechohabiente tiene una de las tasas más altas de morbilidad por tuberculosis pulmonar dentro de la población del AMM. Se contó con el invaluable apoyo del personal médico y de enfermería del departamento de Medicina Preventiva de la UMF No. 28, de los pacientes con tuberculosis que aceptaron participar en el estudio, asi como del Laboratorio de Histocompatibilidad del Hospital de Especialidades No. 25 del IMSS.

II. ANTECEDENTES

2.1 Tuberculosis pulmonar

2.1.1 Definición

La tuberculosis (Tb) es una infección bacteriana de curso subagudo o crónico, cuyos principales agentes causales son especies que conforman el complejo tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis, M. africanum* y *M. microti*. Los pulmones son especialmente susceptibles a la tuberculosis, pero la infección puede afectar cualquier otro órgano, como riñones, huesos, ganglios linfáticos y cerebro (Rossman y Mac Gregor, 1994).

La tuberculosis pulmonar (TbP) causada por micobacterias del complejo de la tuberculosis, debe diferenciarse por estudios bacteriológicos de otras enfermedades infecciosas pulmonares indistinguibles clínicamente de la tuberculosis, como la nocardiosis pulmonar, así como las producidas por otras micobacterias, conocidas como MOTT, por sus siglas en Inglés "*mycobacteria other than tuberculosis*", tales como *M. avium*, *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. intracellulare* (Rossman y Mac Gregor, 1994).

2.1.2. Historia natural de la tuberculosis pulmonar

La TbP es una enfermedad multifactorial, cuyo desarrollo e historia natural resulta de la interacción de factores ambientales y genéticos. Las personas infectadas con tuberculosis no necesariamente desarrollarán la enfermedad (Bloom y Murray, 1992).

En algún tiempo después del nacimiento, un individuo puede ser infectado con *M. tuberculosis* por primera vez. Esta infección primaria usualmente es adquirida por vía aerógena de alguien que padece tuberculosis pulmonar activa

(Smith y Moss, 1994). Al suceder esta infección, el sistema inmune aísla al agente causal con una gruesa cubierta cerosa, que luego se calcifica. Así, las micobacterias pueden permanecer viables por muchos años (Chan y Kaufmann, 1994).

Smith y Moss (1994), indican que la enfermedad se desarrolla en un individuo como una consecuencia de uno de tres procesos: a) progresión de la infección primaria, b) reinfección exógena (adquiriendo una nueva infección de otro individuo infectado) o c) reactivación endógena (activación de una infección anterior en estado latente).

Cuando el sistema inmune se deprime, como sucede en edad avanzada, así como en enfermos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las oportunidades de desarrollar la enfermedad son especialmente grandes, ya sea por reactivación endógena o por reinfección exógena (Smith y Moss, 1994). La infección por VIH es, hasta nuestros días, el riesgo más fuerte para el desarrollo de la tuberculosis (Lucas y Nelson, 1994).

La Tb también ha sido asociada al alcoholismo, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus, enfermedades neoplásicas y abuso de drogas (Hopewell, 1994).

Con el uso de técnicas convencionales, es difícil distinguir entre una reactivación y una reinfección, pero hoy en día con el desarrollo de las técnicas moleculares es posible determinar cuándo se trata de una infección nueva o la reactivación de una vieja (Smith y Moss, 1994).

Algunos síntomas de la TbP, además de tos, dolor pleurítico, respiraciones cortas, no son específicamente relacionados al órgano o tejido involucrado, sino que son sistémicos en naturaleza o son remotos del sitio de la enfermedad, incluyendo fiebre, malestar pérdida de apetito y pérdida de peso (Hopewell, 1994).

Debido a la disponibilidad de tratamientos efectivos contra la tuberculosis es difícil realizar estudios de seguimiento a partir del inicio de los síntomas de la enfermedad para estudiar su historia natural. Estudios realizados en Gran Bretaña y en India antes de la quimioterapia, presentaron resultados similares: cerca del 50% de los pacientes con esputo positivo para bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) murieron dentro de los cinco años de establecido el diagnóstico, 30% se auto curaron y el restante 20% permanecieron vivos (Smith y Moss, 1994).

Actualmente las tasas de muerte en los países en desarrollo no son tan altas como se hubiera pensado, gracias al número de casos que fueron detectados y tratados apropiadamente (Snider et al., 1994). En áreas que no son endémicas y donde no existen cepas de micobacterias resistentes a medicamentos de primera elección, el 95% de los casos curan con el tratamiento médico adecuado y oportuno en 6 a 9 meses, y solamente del 3 al 5 % ameritan cirugía por lesiones residuales (Kumate y Gutiérrez, 1980). Pero en los casos donde existe un cuadro de inmunosupresión o cuando los pacientes se infectan con cepas multirresistentes, o la combinación de ambos factores, el pronóstico puede ser mucho menos favorable, el porcentaje de curación mucho menor y el tiempo de tratamiento considerablemente más largo (Said-Fernández et al., 2001).

En el curso de la enfermedad influyen favorablemente el diagnóstico y tratamiento oportunos y la presencia de cepas susceptibles a los cinco medicamentos antituberculosos de primera elección (estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol, y pirazinamida). Por el contrario, influyen desfavorablemente los siguientes factores:

a) Inicio del tratamiento específico cuando la enfermedad ya está avanzada; en este caso es importante el tipo, localización y extensión de las lesiones (Kumate y Gutiérrez, 1980; Alcaide et al., 1996).
b) Desnutrición y factores intercurrentes como el tabaquismo, alcoholismo, drogadicción, hacinamiento, malas condiciones de higiene en la vivienda

(Kumate y Gutiérrez, 1980; Alcaide et al., 1996) y diabetes mellitus (Hopewell, 1994).

c) Presencia de micobacterias resistentes a uno, dos o más medicamentos; sobre todo a isoniazida y rifampicina (Mandell et al., 1991).
d) Asociación con padecimientos infecciosos (sarampión y tos ferina) o con padecimientos que alteran la inmunidad (SIDA, agammaglobulinemia, linfomas y tratamiento con esteroides e inmunosupresores) (Mandell et al., 1991),
e) Abandono del tratamiento por parte de los pacientes (Mandell et al., 1991).
f) Resistencia o susceptibilidad inmunológica natural, frecuentemente asociada a condiciones extrínsecas de riesgo (Mandell et al., 1991).

2.1.3 Epidemiología de la tuberculosis pulmonar

La TbP es una enfermedad contagiosa. Cuando los enfermos con TbP tosen, estornudan, hablan o escupen, propalan en el aire minúsculas gotas de saliva o expectoración conteniendo cada una de 3 a 10 bacilos, las cuales se difunden en el aire que rodea al enfermo; a estas personas se les conoce como bacilíferas [en inglés llamadas “smear-positive”, en español BAAR+ (o “baciloscopía positiva”) ya que se observan BAAR en muestras de origen pulmonar] y sólo ellas son infecciosas (Smith y Moss, 1994).

La tuberculosis se considera un problema mundial de salud pública por su amplia distribución, prevalencia y mortalidad. La incidencia mundial de tuberculosis está creciendo a razón de 0.4% cada año, pero esta velocidad es aún mayor en el África Sub-sahariana y en los países que formaron la Unión Soviética. En el año de 2001, un total de 155 países (representando el 61% de la población mundial) notificaron a la OMS 2.4 millones de casos nuevos de tuberculosis, de los cuales 1.2 millones tuvieron BAAR+ en muestras de origen pulmonar. Se estima que los 1.2 millones de BAAR+ representan solamente el 32% de la incidencia estimada (WHOb, Report 2003). Se ha calculado que cerca de la tercera parte de la población mundial es portadora del bacilo de la tuberculosis (1,722 millones),

pero solamente el 10% de las personas infectadas desarrolla la enfermedad. Se estima que diariamente 23,000 personas desarrollan tuberculosis activa y cerca de 5,000 mueren por esta causa (WHO, 2002). Además, cada paciente bacilífero puede infectar de 10 a 20 personas más en un período de dos años. (Mandell et al., 1991). La prevalencia mundial estimada de la tuberculosis es de 30 millones de casos, los cuales en su mayoría son TbP. El 80% de estos casos ocurren en los países en vías de desarrollo (Centers for Disease Control, 1993).

En el oeste de Estados Unidos la tuberculosis es una enfermedad que se presenta en forma creciente en los habitantes pobres de las ciudades, en particular en las minorías étnicas. Actualmente los grupos etarios más susceptibles a desarrollar la enfermedad son los niños y los ancianos. Algunos grupos especiales, como drogadictos, pacientes con enfermedad renal terminal, ancianos residentes en asilos y pacientes con SIDA, presentan una tasa de morbilidad mucho mayor que el resto de la población general (Mandell et al., 1991).

En Estados Unidos, la inmigración poblacional está contribuyendo a la dispersión de la tuberculosis (Brudney y Dobkin, 1991). Bloom y Murray (1992) propusieron que cerca de un cuarto del aumento en la incidencia de tuberculosis se debe a la transmisión del agente causal en hospitales, personas sin hogar, refugios, prisiones, y otras situaciones de vida comunitaria. Ellos estiman que un tercio de la tuberculosis es debido a la infección por VIH.

La infección por bacilos de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes, así como la infección por VIH está propiciando la diseminación de la enfermedad en ámbitos económicos y sociales antes no previstos (World Health Organization, 1996) y en los que se ha observado que la tasa de progresión de la infección pasada o reciente al estado de enfermedad activa es más alta y se presenta con mayor rapidez (Raviglione et al., 1992).

En los últimos siete años, en México se han reportado entre 14,000 y 16,000 casos nuevos. Desde 1998 se ha presentado una ligera reducción. En 2002 se informó de 14,319 casos nuevos (Epidemiología, 2003).

La OMS informó que México notificó 10,852 casos nuevos de TbP en 1996, aunque el número estimado por esta organización es cinco veces mayor (John Hopkins Center for Tuberculosis Research, 1996).

2.1.4 Diagnóstico Clínico de la tuberculosis pulmonar

Una herramienta para el diagnóstico de tuberculosis es la prueba intradérmica a la tuberculina, efectuada con PPD (por sus siglas en inglés *purified protein derivate of tuberculin*), en español DPP (*derivado proteínico purificado*). Esta prueba es positiva en la mayoría de la gente que, después de la infección primaria, no desarrolla la enfermedad y se asume que monta una respuesta inmune efectiva. También es positiva en pacientes con formas leves de tuberculosis, sin embargo, no es una alternativa de diagnóstico en países que aplican en forma masiva la vacuna BCG, porque la prueba con DPP resulta positiva en personas vacunadas. Además, es frecuentemente negativa en pacientes con cuadros muy severos de tuberculosis (von Pirquet, 1908; Kent y Schwartz, 1967; Howard et al., 1970).

Frecuentemente el diagnóstico se establece reuniendo los siguientes criterios:

1) antecedente epidemiológico de contacto con enfermo tuberculoso (COMBE positivo) (Kumate y Gutiérrez, 1980).
2) manifestaciones clínicas sugestivas de la enfermedad: 90% de los pacientes BAAR+ tienen síntomas objetivos tales como tos, fiebre, pérdida de peso, expectoración o hemoptisis (Styblo et al., 1967).
3) lesiones pulmonares detectadas mediante análisis de imagen.

4) observación directa (baciloscopía) de BAAR en muestras de esputo, jugo gástrico o lavados laríngeo o bronquioalveolar (Kumate y Gutiérrez, 1980).

El diagnóstico de certeza de tuberculosis sólo puede hacerse mediante el cultivo de *M. tuberculosis* (Strong y Kubica, 1981). Para el cultivo se utilizan diversos líquidos corporales y biopsias de tejidos de los pacientes, como fuentes de micobacterias (Kumate y Gutiérrez, 1980). Actualmente existen métodos moleculares alternos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987; Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Voet y Voet, 1995) que son tan específicos y sensibles o más que los métodos tradicionales de cultivo, debido a que reducen considerablemente el tiempo para obtener los resultados. No obstante, el costo y requerimientos técnicos han limitado su generalización.

2.1.5 Tratamiento

En 1993, la OMS recomendó el DOTS (por sus siglas en inglés: *directly observed therapy, short-course*) (De Cock y Chaisson, 1999) conocido por sus siglas en español como TAES (*tratamiento acortado estrictamente supervisado*), como una estrategia de tratamiento para detección y cura de la tuberculosis (Grange y Zumla, 2000).

El TAES combina cinco elementos: compromiso político, servicios de microscopía, provisión de medicamentos, sistemas de vigilancia y monitoreo y uso de regímenes altamente eficaces con observación directa del tratamiento (Pozsik, 1993).

2.1.6 Susceptibilidad y resistencia naturales a la tuberculosis pulmonar

Desde un punto de vista genético, se ha enfatizado que la susceptibilidad hereditaria y la resistencia del huésped son factores determinantes para que se

desarrolle o no un cuadro clínico de tuberculosis pulmonar (Lurie, 1964; Comstock, 1978; Hafez et al., 1983).

Uno de los genes relacionados con susceptibilidad o resistencia a tuberculosis es el locus Bcg/Ity/Lsh, el cual ha sido localizado utilizando ratones transgénicos. Por este modelo se encontró que este gen murino determina la susceptibilidad de cepas endogámicas a la infección con parásitos intracelulares no relacionados, tales como *M. bovis*, *Salmonella typhimurium* y *Leishmania donovani*. Se han identificado dos alelos designados Bcg^s y Bcg^r (Blackwell, 1989) para susceptibilidad y resistencia a tuberculosis respectivamente. Una substitución única no conservativa del aminoácido glicina por ácido aspártico en la posición 169 correlacionó con el fenotipo Bcg^s en 27 cepas endogámicas de ratón (Malo et al., 1994).

Por otro lado, se demostró que los genes Nramp1 (*Natural Resistance-associated Macrophage Protein*) y el Bcg/Ity/Lsh son alélicos (Vidal et al., 1995; Kishi et al., 1996; Yoshida et al., 1999). Gruenheid y Gros (2000), proponen que la proteína Nramp1 afecta la replicación microbiana intrafagosomal debido a que modula el contenido de los cationes divalentes en este organelo y los transportadores tanto mamíferos como bacterianos pueden competir por el mismo substrato en el espacio fagosomal.

El gen humano denominado NRAMP1, homólogo al del ratón Nramp1, se localizó en el cromosoma 2, banda 2q35, aunque no se encontraron mutaciones equivalentes a la mutación que confiere susceptibilidad al ratón (Blackwell et al., 1995). Se han identificado cuatro variantes del gen NRAMP1, un microsatélite 5’ al sitio de iniciación de la transcripción, una deleción TGTG en la región 3’ no traducida (1729+55del4), una transversión G a C en el intrón 4 (469+14G/C) y una substitución de aminoácido no conservativa en el codón 543 (D543N). Aquellos individuos heterocigotos portadores de dos variantes alélicas NRAMP1 están sobre representados en población con tuberculosis, lo que demuestra su

importancia como gen de susceptibilidad en poblaciones humanas (Novartis 217, 1998).

Otro gen que ha sido asociado con susceptibilidad a tuberculosis es el responsable de la deficiencia de la vitamina D particularmente en la tuberculosis cutánea (Davies, 1985).

Aunque la susceptibilidad a tuberculosis en poblaciones humanas es debida a una interacción compleja de un gran número de factores genéticos y ambientales, es posible identificar en el huésped a los primeros, que conducen a un riesgo incrementado de padecer la enfermedad, mismos que deberán ser probados en diferentes poblaciones y en diferentes medio ambientes (Novartis 217, 1998).

Dicha resistencia o susceptibilidad se ha atribuido, entre otras causas, a los llamados mecanismos efectores de genes de respuesta inmune y factores que modulan la susceptibilidad genética (McLeod et al., 1995). Los primeros fueron posteriormente denominados Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (Janeway, 1996).

Siendo la tuberculosis una enfermedad multifactorial, no se puede negar una predisposición genética para su desarrollo como infección activa. Meyer et al., (1998) reconocen que la inmunosupresión y el progreso de la enfermedad parecen ser controlados por el sistema HLA (por sus siglas en inglés *human-leucocyte-associated*) del CMH y en contraste, la resistencia innata a una infección micobacteriana parece ser dependiente de genes no HLA.

2.2 Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El sistema inmunitario protege al individuo de la invasión por células cancerosas, bacterias, virus, hongos, helmintos y otros parásitos. El sistema

inmunitario debe discriminar entre lo “propio” y lo “extraño”, lo que se reconoce por las células T sólo en unión con moléculas del CMH (Janeway, 1996).

El CMH comprende una serie de genes cercanamente relacionados cuyos productos están comprometidos con la regulación de la respuesta inmune. Estos genes son notoriamente polimórficos y son heredados de manera mendeliana de padres a hijos y son codominantes; lo cual ha permitido que sean usados como marcadores genéticos en el estudio de las enfermedades, principalmente de aquellas cuya etiología tiene un fondo inmunológico. El estudio de las frecuencias génicas del CMH y sus antígenos correspondientes también se han empleado en la caracterización de la estructura genética de algunas poblaciones y en la selección de candidatos para trasplante de órganos y tejidos (Acosta-Altamirano, 1992).

El CMH (Fig. 1) se compone de siete loci localizados en el brazo corto del cromosoma 6 banda p21.3. Estos son A, B, C, DR, DQ, DM y DP los cuales codifican para las moléculas CMH. Las moléculas CMH y los genes que las codifican, caen dentro de tres clases: clase I: las A, B, C, también llamadas moléculas clásicas de histocompatibilidad, clase II (DR, DQ, DM y DP), y clase III (factores del complemento C2 y C4 de la vía clásica y el factor B de la vía alterna). Las moléculas del CMH clase III no actúan como antígenos de trasplante y no presentan antígenos a los linfocitos T (Janeway, 1996). Las moléculas A, B, C, DR y DQ pueden ser detectadas serológicamente, las moléculas DM y DP son detectadas por ensayos celulares (Gorodezky, 1997).

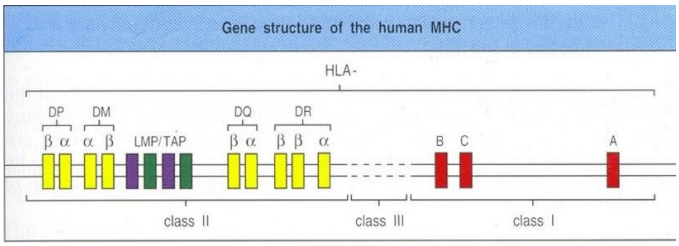

Figura 1.- Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano (Janeway, 1996).

Las moléculas CMH clase I y II constituyen lo que en el humano se conoce como sistema HLA, y se pueden distinguir en razón de su estructura, distribución tisular y además por sus diferentes funciones (Roitt et al., 1998).

Las moléculas HLA clase I (Fig. 2), están formadas por dos cadenas polipeptídicas, una cadena α o cadena pesada codificada en el CMH y una más pequeña asociada no covalentemente, β_2-microglobulina, la cual no es codificada en el CMH. Sólo la cadena α está anclada a la membrana celular. La molécula tiene cuatro dominios, tres formados por la cadena α (α_1, α_2, α_3) y uno por la cadena β_2-microglobulina. Los dominios α_3 y β_2-microglobulina tienen una estructura plegada que semeja la de una inmunoglobulina. El rasgo más distintivo de las moléculas CMH es la estructura formada por los dominios α_1 y α_2, las que generan una hendidura en la superficie de la molécula que es el sitio de unión con el péptido. Están presentes en la superficie celular de todas las células nucleadas, lo que es apropiado para su función fisiológica, ya que estos antígenos son parte de un mecanismo que permite a los linfocitos T citotóxicos reconocer a cualquier célula que haya sido infectada por un microorganismo intracelular (Alberts et al., 1994). Para que un antígeno sea reconocido por un linfocito T CD8+ (en su mayoría citotóxicos), el antígeno deberá reconocerse en combinación con una molécula HLA clase I (Janeway, 1996).

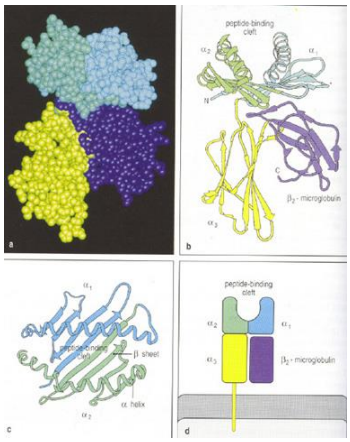

Figura 2.- Moléculas HLA clase I, (Janeway, 1996).

La fuente de péptidos para las moléculas HLA clase I es la degradación de proteínas en el citosol. La digestión de proteínas citosólicas es llevada a cabo por una estructura formada por varias proteínas llamada proteosoma. El proteosoma contiene un arreglo de 28 subunidades, para formar una estructura cilíndrica que tiene seis sitios proteolíticos activos (Janeway, 1996).

Los péptidos que resultan de esta digestión se transportan al lumen del retículo endoplásmico rugoso, de ahí al aparato de Golgi, donde se ensambla la β2 microglobulina y el antígeno extraño con las proteínas CMH tipo I, se forman vesículas conteniendo los complejos, las cuales son transportadas hasta la membrana plasmática de la célula, para ser presentados. Una vez que el antígeno se inserta en el surco de la molécula HLA clase I, arriba descrita, este complejo HLA-antígeno es reconocido por los linfocitos T CD8+ (citotóxicos), y como consecuencia de ello, si es un antígeno extraño, esta célula se activa y destruye a las células infectadas (Alberts et al., 1994).

Así como los linfocitos T CD8+ reconocen los péptidos sólo en el contexto de una molécula clase I, los linfocitos T CD4+ (cooperadores) reconocen los fragmentos peptídicos (epitopos) sólo en el contexto de las moléculas clase II. La función de estas moléculas es presentar los péptidos antigénicos procesados a los linfocitos T CD4+, durante la iniciación de las respuestas inmunitarias. Estas moléculas tienen distribución celular limitada, se encuentran predominantemente en células especializadas, conocidas como presentadoras de antígeno. Estas células derivan de la médula ósea y comprenden un heterogéneo grupo de células, incluyendo células dendríticas en órganos linfoides y células Langerhans en la piel, así como células B y macrófagos (Roitt et al., 1998).

Las moléculas HLA clase II (Fig. 3) consisten de un complejo no covalente de dos cadenas transmembranales α y β. Su estructura cristalina muestra una forma plegada muy similar a las HLA clase I. Las mayores diferencias subyacen en que las terminales de la hendidura en donde se une el péptido, son más

abiertas en las moléculas HLA clase II. La consecuencia de esta estructura es que las terminales de un determinado péptido ligado a una molécula clase I están substancialmente más hundidas dentro de la molécula, mientras que las terminales de péptido ligado a una molécula HLA clase II no lo están. Los péptidos que se unen a estas moléculas son de al menos trece aminoácidos de longitud y pueden ser mucho más largos (Janeway, 1996).

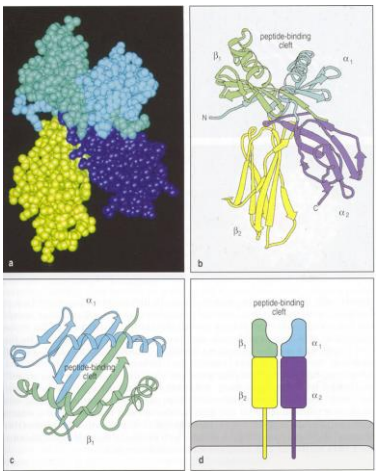

Figura 3.- Moléculas HLA clase II, (Janeway, 1996).

Mientras que los virus y algunas bacterias se replican en el citosol y son presentados por moléculas HLA clase I, algunas clases de patógenos entre los que se encuentran las micobacterias, se replican en vesículas intracelulares, en macrófagos. Como ellas residen en vesículas encerradas por una membrana, las proteínas de esos patógenos no son accesibles a los proteosomas. En vez de esto, las proteínas son degradadas en este sitio por proteasas vesiculares originando fragmentos peptídicos que se unen a las moléculas clase II para ser liberadas a la superficie celular (Janeway, 1996).

Mediante este mecanismo se reconocen epitopos de proteínas de patógenos intravesiculares, patógenos extracelulares, toxinas o cualquier otro material proteico que haya sido endocitado y digerido por células fagocíticas especializadas (Janeway, 1996). Este proceso se lleva a cabo, en términos

generales, de la siguiente manera: el antígeno íntegro es endocitado por la célula presentadora de antígeno y llega al interior de ésta en un endosoma temprano, el cual madura a medida que se internaliza en la célula. Entonces se torna en endosoma tardío. En la membrana de este endosoma tardío se insertan moléculas preensambladas clase II, las cuales tienen unidas unas proteínas llamadas cadenas invariantes, las cuales evitan que estos heterodímeros capturen péptidos en el lumen del retículo endoplásmico rugoso, y dirigen a las moléculas HLA clase II desde la red trans-Golgi al endosoma (donde se encuentra con el antígeno extracelular). En el fagosoma tardío, el antígeno extracelular puede someterse a una proteólisis limitada, y algunos fragmentos unirse al heterodímero clase II, ya libre de la cadena invariante, dirigirse en una vesícula a la membrana plasmática y ensamblarse en ésta, o ser degradado completamente en un lisosoma. En el primer caso, al entrar en contacto el heterodímero clase II con el epitopo, el heterodímero inmediatamente lo captura y lo fija en el canal que forman sus dominios α_1 y β_1. Como antes comentamos, estos complejos son reconocidos por los linfocitos T $CD4^+$. Para que estos linfocitos se activen se requieren dos tipos de señales: La señal uno es el complejo formado por el antígeno de histocompatibilidad clase II que tiene unido al antígeno extracelular (arriba descrito), el cual activa un receptor constituido por una serie de proteínas invariantes llamado complejo CD3. Se piensa que este complejo activa una serie de tirosina-quinasas, entre ellas la proteína *Fyn* (que forma parte del complejo CD3) y otras proteínas, entre ellas una fosfolipasa C γ, que a su vez activa la ruta de señalización del inositol específico en la superficie del linfocito T $CD4^+$. La segunda señal puede ser una señal secretada, por ejemplo interleucina-1 (IL-1) o la proteína B7, unida a la superficie de la célula presentadora de antígeno. B7 es reconocida por el co-receptor CD28 presente en el linfocito *cooperador*. Si está presente la señal 1, pero no la 2, la célula *cooperadora* puede quedar inactivada. En cambio, si el linfocito T $CD4^+$ recibe ambas señales, entonces éste se activa, se inicia una proliferación clonal y se secretan una variedad de interleucinas. Una vez que el linfocito T $CD4^+$ ha sido estimulado por el antígeno, otra serie de proteínas son reclutadas para incrementar la fuerza de unión entre la célula

cooperadora o los linfocitos T $CD4^+$ y la célula blanco. Por otro lado, los macrófagos son activados por efecto de las interleucinas de los linfocitos T $CD4^+$ activados. Entre las linfocinas que activan los macrófagos se encuentran las interleucinas 4 y 10, el interferón γ (INF-γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α). Los macrófagos activados son capaces de reconocer y destruir otras células que presenten en su superficie los mismos epitopos que desencadenaron la respuesta inmune celular y excretar citocinas, como IL-1, además de intermediarios de oxígeno (Ej. H_2O_2) y nitrógeno reactivos [Ej. óxido nítrico (NO)] (Janeway et al., 1997).

Un comité internacional de expertos (*WHO nomenclature committee for factors of the HLA system*) es el responsable de poner al día la descripción de la organización y la nomenclatura del sistema HLA. Los grupos de antígenos reconocidos por este comité son HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, y –DP. Para las moléculas HLA, éstos se denominan por el locus (HLA-A, -B, -C), o subregión para clase II (HLA-DR, -DQ y –DP), lo que determina la especificidad antigénica, y un número. Los antígenos públicos son determinantes comunes a diversas moléculas, por ejemplo: DR51 es el antígeno público del DR2, a su vez, del DR2 se derivan dos subtipos: el DR15(2) y el DR16(2), lo que se indica con los números entre paréntesis. Las variantes alélicas a nivel molecular, se especifican anotando la cadena molecular donde se encuentra el polimorfismo y un número que corresponde al alelo respectivo y el número de la variante: DR16(2) (DRB1*1602).(Bodmer et al., 1997).

2.2.1 Asociación HLA-enfermedad

La asociación del HLA con alguna enfermedad se establece cuando la presencia de un antígeno HLA es necesaria para la expresión fenotípica de ese gen de susceptibilidad a la enfermedad, lo que no indica necesariamente ligamiento genético (Janeway, 1996).

Cuando un individuo tiene algún antígeno HLA en particular, asociado estadísticamente a una patología, tiene un riesgo mayor a padecerla que la población general. En base a que las moléculas HLA son receptores de agentes etiológicos, tales como virus, toxinas u otras sustancias extrañas y el HLA es selectivo para péptidos antigénicos, se han propuesto varias hipótesis para explicar las asociaciones de HLA y enfermedad (Janeway, 1996):

a) los agentes causales mimetizan las moléculas HLA, por lo que el agente etiológico se aprecia como propio y no se monta respuesta inmunitaria, y el agente causal produce la enfermedad sin interferencia con la respuesta inmunitaria del receptor.
b) el agente causal se designa como ajeno y se monta una respuesta inmunitaria vigorosa contra el agente etiológico semejante al HLA propio. La respuesta inmunitaria se dirige contra el antígeno HLA, y es esta respuesta "autoinmunitaria" la que produce la enfermedad. Este caso se debe a la similitud del agente y el antígeno HLA.
c) la expresión de las moléculas del CMH clase II es aberrante. Si las células tejido-específicas son inducidas a expresar moléculas clase II, cuando se degradan, pueden llevar a un "procesamiento antigénico", formando un complejo antigénico iniciando la respuesta inmunitaria contra la molécula tejido-específica.

La asociación de una enfermedad en particular con un antígeno HLA se cuantifica mediante el cálculo del riesgo relativo (RR), que se define como la probabilidad de desarrollar la enfermedad cuando el individuo tiene el antígeno HLA asociado con enfermedad, en comparación con un individuo que carece de tal antígeno (Janeway, 1996), utilizando la siguiente ecuación:

$$RR = \frac{\text{Probabilidad de que un individuo tenga la enfermedad} \mid \text{HLA}}{\text{Probabilidad de que un individuo tenga la enfermedad} \mid \text{No HLA}}$$

Se ha demostrado la participación del sistema HLA en algunas enfermedades reumatológicas, entre ellas la fiebre reumática en donde se han encontrado antígenos diferentes incrementados para cada población, y el HLA-A3 en familias mexicanas con niños afectados de cardiopatía reumática en la forma aguda (Rodríguez-Suárez, 1994).

Otras enfermedades autoinmunes que han sido asociadas a HLA (Lechler, 1994): enfermedad celíaca (B8, DR3, DQw2), diabetes insulina-dependiente (DR3,4 DQw7/8), esclerosis múltiple (DRw15, DQw6; en caucásicos) y síndrome de Goodpasture (DRw15, DQw6). De acuerdo con Gorodezky (1994), la lepra, causada por *M. leprae* también ha sido asociada a HLA (DR2 y DR3).

2.2.2 Asociación HLA-tuberculosis

El genotipo HLA ha sido asociado con la susceptibilidad a la tuberculosis pulmonar.

La asociación de HLA con riesgo de padecer TbP, se conoce como asociación positiva. Por el contrario, la asociación de antígenos HLA con resistencia o protección contra TbP, se conoce como asociación negativa (Meyer et al., 1998).

Se ha detectado asociación positiva entre tuberculosis y varios antígenos HLA clase I en diferentes poblaciones humanas, pero estos han variado de una población a otra (Chukanova et al., 1995; Hafez et al., 1992; Knoring et al., 1995; Dovgaliuk et al., 1995). En cambio, los isotipos HLA-DR y –DQ han presentado una mayor consistencia, lo que sugiere una mayor especificidad en la asociación. Bothamley et al., (1989) y Bothamley y Schreuder (1992), proponen que el mecanismo de la asociación positiva con respecto a DR15(2) es una similitud de esta molécula con una proteína de 38kDa de *M. tuberculosis*, lo que conduce a la probable aceptación de los antígenos como propios y a la multiplicación irrestricta de la micobacteria, dando lugar a formas severas (Rani et al., 1992).

En diferentes poblaciones de Rusia, se asoció al antígeno HLA-DR2 con TbP (Chukanova et al., 1995; Khomenko et al., 1990) y con formas severas de esta enfermedad (Fedoseeva et al., 1993). En niños, la presencia de los antígenos HLA-DR2 y DR5 se relacionó con un factor de riesgo 5-9 veces mayor que en los niños no portadores de dichos antígenos (Dovgaliuk et al., 1995). La ocurrencia de DR2 en población de la India (Brahmajothi et al., 1991), de Indonesia (Singh et al., 1983; Singh et al., 1983, Bothamley et al., 1989) y en población China (Mehra et al., 1986) sugiere su asociación con la susceptibilidad a esta enfermedad. P. Selvaraj demostró que los genes/productos génicos de HLA-DR2 pueden estar asociados con un papel regulatorio en el mecanismo de enfermedad en la susceptibilidad a tuberculosis (citado por Sriram, 2001).

En una población de Indonesia se encontró asociación entre una mayor respuesta a la tuberculina en los pacientes positivos para el antígeno HLA-DR15(2) que en los pacientes negativos a este antígeno (Bothamley et al., 1995).

Así también en población de la India, además de asociar a DR15(2), con susceptibilidad a tuberculosis pulmonar [DR15(2) (DRB1*1501, DRB1*1502) (Mehra et al., 1991), DR15(2) (DRB1*1501) (Mehra et al., 1995; Ravikumar et al., 1999)], se encontró un alto factor de riesgo para desarrollar formas severas de resistencia a medicamentos antituberculosos, en aquellos pacientes con dos alelos del antígeno HLA-DR15(2) (DRB1*1501 y DRB1*1502), (Rajalingam et al., 1996). En población mexicana también ha sido asociado el antígeno HLA-DR15 (DR15(2) (DRB1*1501)) con susceptibilidad a tuberculosis pulmonar (Terán-Escandón et al., 1999).

Otro subtipo de HLA-DR2, DR16(2), fue asociado positivamente a tuberculosis en población de la India (HLA-DR16(2) (DRB1*1602)), (Mehra et al., 1991) y en población de Polonia (Dubaniewicz, 2000). En población del Sur de China, este mismo alelo se correlacionó cercanamente a la incidencia de TbP, o se piensa que está ligado a genes susceptibles funcionales (Liu et al., 2004).

Respecto a los antígenos HLA-DQ, algunos de ellos han sido asociados positivamente a tuberculosis en población Asiática de la India, como es el HLA–DQ5(1)(DQB1*0502) (Mehra et al., 1991) y HLA-DQ6(1)(DQB1*0601) (Mehra et al., 1995, Ravikumar et al., 1999), ambos alelos en asociación con HLA-DR15(2). Goldfeld et al., (1998), encontraron a HLA-DQ5(1)(DQB1*0503)) asociado al desarrollo de tuberculosis clínica en población Camboyana. En población mexicana ha sido encontrado DQ5(1)(DQB1*0501) asociado a tuberculosis (Terán-Escandón et al., 1999).

A nivel de haplotipo, sólo ha sido informado uno como asociado a tuberculosis: /DR15(2)-DQ6(1)(/DRB1*1501-DQB1*0601) (Mehra et al., 1995, Ravikumar et al., 1999).

En cuanto a la relación entre raza y susceptibilidad a tuberculosis, estudios epidemiológicos indican que la población negra puede ser más susceptible que la blanca a la infección por *M. tuberculosis*. Se ha sugerido que esto está relacionado con la expresión de los antígenos clase II HLA-DR en los leucocitos de la población de raza negra (McPeek et al., 1992). Estos hallazgos, junto con la incidencia incrementada de tuberculosis entre ciertos grupos étnicos, demuestran que hay un componente genético en la susceptibilidad a esta enfermedad (Hafez et al., 1992).

Se ha informado asociación negativa de antígenos HLA-DR y –DQ con TbP: DR6 en población de la India (Singh et al., 1983), DR3 en población mexicana (Cox et al., 1988) y DQ3 en población Indonesia (Bothamley et al., 1989). Se ha sugerido que la expresión de los alelos DR1 y DR13, puede ser asociada con un efecto antagonista en la patogénesis de tuberculosis pulmonar en población China (Liu et al., 2004).

En resumen, los antígenos HLA-DR y -DQ que han sido involucrados en la patogénesis de la tuberculosis pulmonar, se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Asociación de TbP con algunos antígenos HLA-DR y –DQ y haplotipos HLA-DR/-DQ en diferentes poblaciones del mundo.

Antígeno/Haplotipo HLA Asociado a TbP	Tipo de asociación	Población	Referencia
DR1	Negativa	China	(Liu et al., 2004)
DR2	Positiva	Rusa	(Chukanova et al., 1995; Khomenko et al., 1990; Fedoseeva et al., 1993; Dovgaliuk et al., 1995)
DR2	Positiva	India	(Brahmajothi et al., 1991)
DR2	Positiva	Indonesia	(Singh et al., 1983; Singh et al., 1983; Bothamley et al., 1989)
DR2	Positiva	China	(Mehra et al., 1986)
DR3	Negativa	Mexicana	(Cox et al., 1988).
DR5	Positiva	Rusa	(Dovgaliuk et al., 1995)
DR6	Negativa	India	(Singh et al., 1983)
DR13	Negativa	China	(Liu et al., 2004)
DR15(2)	Positiva	Indonesia	(Bothamley et al., 1995)
DR15(2) (DRB1*1501)	Positiva	India	(Mehra et al., 1991; Mehra et al., 1995; Ravikumar et al., 1999)
DR15(2) (DRB1*1502)	Positiva		(Rajalingam et al., 1996)
DR15(2) (DRB1*1501)	Positiva	México	(Terán-Escandón et al., 1999)
DR16(2) (DRB1*1602)	Positiva	India	(Mehra et al., 1991)
DR16(2)	Positiva	Polonia	(Dubaniewicz, 2000)
DR16(2)	Positiva	China	(Liu et al., 2004)
DQ3	Negativa	Indonesia	(Bothamley et al., 1989)
DQ5(1) (DQB1*0502)	Positiva	India	(Mehra et al., 1991)
DQ5(1) (DQB1*0503)		Camboya	(Goldfeld et al., 1998)
DQ5(1) (DQB1*0501)		México	(Terán-Escandón et al., 1999)
DQ6(1) (DQB1*0601)	Positiva	India	(Mehra et al., 1995; Ravikumar et al., 1999)
DR15(2)-DQ6(1) (DRB1*1501-DQB1*0601)	Positiva	India	(Mehra et al., 1995; Ravikumar et al., 1999)

Se ha sugerido que el estudio comprensivo de estos marcadores genéticos permite evaluar rápidamente la naturaleza de un proceso tuberculoso, definir su prognosis y bajo estas bases, elegir el tratamiento adecuado que debe consistir en una quimioterapia más agresiva y específica en aquellos con antígenos HLA que predisponen a un cuadro clínico más fuerte (Chukanova et al., 1995), así como en individuos sanos expuestos a *M. tuberculosis* para ser utilizado en consejo genético (Hafez et al., 1992).

2.2.3 Tipificación de los antígenos HLA

Entre los diversos métodos existentes para la tipificación de los antígenos HLA se encuentran las técnicas serológicas que han sido tradicionalmente utilizadas como la técnica estándar de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (Terasaki y McClelland, 1964) en la que se utilizan anticuerpos monoclonales para una mayor especificidad de reacción (Reynolds et al., 1994).

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, éstas fueron utilizadas en el campo de la histocompatibilidad y en 1982 Wake et al., describieron el polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP) aplicado a la tipificación de HLA utilizando una sonda DRB, método que se indicó que era más preciso que la serología, la enzima recomendada fue Taq1, a causa de su habilidad para identificar un gran número de polimorfismos con hibridización con DRB, DQB y DQA. Pero los métodos RFLP también presentaron desventajas: no identificaron secuencias polimórficas dentro del segundo exón de DRB, DQB y DQA, sino sitios de restricción situados generalmente fuera de esos exones y en general requirieron asociaciones DR-DQ para discriminar entre ciertos alelos DR que tienen idénticos patrones de RFLP para DRB y eventualmente los RFLPs fueron reemplazados por el desarrollo de nuevas tecnologías como la PCR y entre otros métodos detección por oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP) y PCR-SSP (PCR con sondas de secuencia específica) como indican Middleton y Williams (1997).

Se han realizado algunos estudios comparativos para determinar la utilidad de las técnicas moleculares con respecto a las técnicas serológicas, en donde se han reconocido algunas ventajas de las técnicas moleculares:

a) Se reduce la incidencia de homocigocidad: cuando no es posible determinar el otro antígeno del haplotipo y se reporta como blanco (Bryan et al., 1996).
b) Se han propuesto como una alternativa a la tipificación serológica en la rutina de la práctica clínica idealmente para analizar simultáneamente un número pequeño de muestras (Olerup y Zetterquist, 1992). A su vez, se han recomendado estas técnicas para la identificación de alelos clase II, siempre y cuando se disponga de *iniciadores* adaptados a los antecedentes genéticos de la población en estudio (Dieve et al., 1999). Al recomendar estas técnicas, a su vez se reconoce la utilidad de la serología cuando el tiempo es limitado, tal y como sucede en la tipificación de donador cadavérico, caso en el que la rapidez es vital en la sobrevida de la funcionalidad del órgano a transplantar (Verduyn et al., 1993), o la utilización de ambas técnicas complementariamente; para la identificación de alelos a nivel de fenotipo por técnicas serológicas y de genotipo por técnicas moleculares reconociendo que cada método tiene sus limitaciones técnicas (Doherty y Donaldson, 1991).

Para la detección de los antígenos HLA clase II por métodos serológicos es necesario obtener los linfocitos B, para lo que se han propuesto varias técnicas, entre ellas:

a) Obtención de linfocitos totales por utilización de Ficoll-Hypaque y una columna de lana de nylon y temperatura de 40º C para la separación de linfocitos B. En esta técnica se requiere el uso de medio de McCoy, lo que hace al método más costoso y tardado.
b) Separación de linfocitos B mediante la utilización de inmunoperlas. Las inmunoperlas son partículas superparamagnéticas de menos de un micrón de diámetro, con anticuerpos monoclonales anti-CD19 acoplados en su superficie, que se unen específicamente con los linfocitos B. Las inmunoperlas son colectadas usando un campo magnético. Cuando éste es removido las perlas

no retienen ningún magnetismo residual. Los linfocitos B unidos a las inmunoperlas son marcados con naranja de acridina y bromuro de etidio. Este es un método rápido que no requiere incubación en frío ni otras manipulaciones complicadas (Gorodezky, 1997).

Una vez obtenidos los linfocitos B, mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad, estos son incubados con antisueros específicos anti-HLA, que son anticuerpos fijadores de complemento. Si los linfocitos expresan un antígeno reconocido por estos antisueros, la porción Fab (fracción de unión con el antígeno) del anticuerpo se une al antígeno formando un complejo antígeno-anticuerpo. Después de que esos complejos se han formado, se agrega el complemento de conejo. La fracción C1q y el Ca++ del complemento se unen a la porción FC (fragmento cristalizable) del anticuerpo. La unión de C1q con complejos antígeno-anticuerpo inicia la cascada del complemento que conduce a la lisis de las células. En cada determinación se lleva un control positivo, el que consiste de un anticuerpo monoclonal fuertemente citotóxico para linfocitos B y un control negativo, que proviene de una persona sana de tipo sanguíneo AB y no tiene reactividad citotóxica en pruebas con linfocitos de donadores al azar (Terasaki y McClelland, 1964). Si se obtienen los linfocitos B por la técnica de inmunoperlas, la lisis se detecta observando al microscopio de fluorescencia, donde las células viables (reacción negativa) fluorescen en verde y las muertas (reacción positiva) en rojo (Vartdal et al., 1986) como indica la Fig. No. 4.

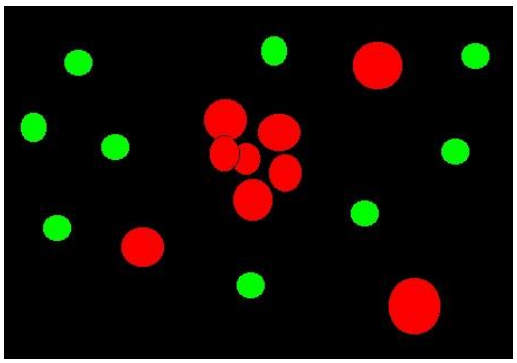

Figura 4.- Representación de la coloración de linfocitos B en reacción positiva (roja) y negativa (verde), marcados con naranja de acridina y bromuro de etidio, observada al microscopio de fluorescencia.

2.3 Antecedentes genéticos de la población del Área Metropolitana de Monterrey (AMM)

El AMM, localizada en la parte central oeste del Estado de Nuevo León, tiene aproximadamente el 81.8% de la población total del Estado (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 1995).

La población del AMM ha sido estudiada de acuerdo a sus antecedentes históricos e inmigracionales con el objetivo de conocer su estructura genética (Garza-Chapa et al., 1982ª; Garza-Chapa, 1983, Garza-Chapa et al., 1987; Garza-Chapa et al., 1995, Garza-Chapa et al., 2000) y se ha encontrado que en esta población mestiza existe homogeneidad genética, lo que la hace ideal para estudios de epidemiología genética (Cerda-Flores et al., 1991).

2.4 Tuberculosis en la población de la Unidad de Medicina Familiar (UMF) No. 28 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Esta Unidad médica se encuentra ubicada en el área urbana de la zona noroeste de la ciudad de Monterrey, N. L.

La población que consulta en esta UMF consta de 112,000 derechohabientes adscritos en 27 consultorios de medicina familiar que operan en turno matutino y vespertino, haciendo un total de 54 consultorios.

El diagnóstico de tuberculosis pulmonar activa se realiza utilizando los siguientes criterios:

a) Síntomas clínicos (fiebre, tos, expectoración, malestar general, pérdida de peso).
b) Pruebas de gabinete (placa de tórax sugestiva de tuberculosis).
c) Baciloscopía positiva para BAAR por la técnica de Ziehl Neelsen (Strong y Kubica, 1981). Una vez detectado un caso, es canalizado al departamento de

Medicina Preventiva donde se confirma el diagnóstico por identificación de las micobacterias por cultivo en medio de Lowenstein Jensen-Holm, el cual a partir de octubre de 1994 se ha realizado en el Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud y actualmente en el Laboratorio de Micobacterias del CIBIN.

En el departamento de Medicina Preventiva de esta clínica se lleva a cabo continuamente un registro de la evolución y tratamiento de los pacientes con tuberculosis (archivo del programa de control de la tuberculosis de la UMF No. 28 del IMSS, Delegación Regional Nuevo León).

Durante el período de 1989 a 1996 la tasa de incidencia ha fluctuado, con un valor mínimo de 37.5 en 1990 y un máximo de 133.9 en 1994, siendo en 1996 de 71.4 por 100,000 derechohabientes. Todas estas cifras han estado por encima de la media institucional a nivel nacional que es de 17.9 por 100,000 derechohabientes. Durante este período, la tasa de defunciones por tuberculosis pulmonar presentó una media de 7.25 por 100,000 derechohabientes.

La estratificación por edades de los pacientes con tuberculosis pulmonar que consultan en la UMF No. 28, para 1996, es la siguiente: el 5.7% de 0 a 15 años, el 33.5% de 15 a 24, el 25.9% de 25-34, el 12.5% de 35-44, el 10.4% de 45-54 y el 12.0% de 55 y más años. En comparación con los datos de 1992, existe un desplazamiento del padecimiento hacia los grupos etarios en edad productiva, lo que concuerda con lo mencionado por Davis (1972).

Durante 1996, la tuberculosis pulmonar se presentó con mayor afectación en los individuos del sexo masculino entre los 15 y los 44 años de edad.

La totalidad de la población con diagnóstico de tuberculosis recibe tratamiento acortado TAES, consistente en la administración de los siguientes medicamentos: isoniazida, estreptomicina, etambutol y rifampicina. El tratamiento ha sido supervisado por un familiar, a quien se le ha capacitado para atender al

paciente y suministrarle los medicamentos. El 17.65% de los pacientes son diabéticos y tienen una mala respuesta al tratamiento. El 11% de todos los pacientes en tratamiento presenta recaídas.

Del análisis de la casuística acumulada, se destaca que el 93% de los pacientes se da de alta por remisión de los síntomas y negativización de las pruebas de laboratorio, lo cual ocurre en un período promedio de 11 meses.

Por medio de cultivo y antibiograma, se ha encontrado una resistencia primaria del orden del 19.7% la cual corresponde (en porcentaje) a la resistencia a los siguientes medicamentos: isoniazida, 68.5%, estreptomicina 14.5%, etambutol 11.5% y rifampicina 5.5%. La resistencia a dos antifímicos se presenta en el 4.3% de las muestras preferentemente en la asociación isoniazida/rifampicina e isoniazida/etambutol. La resistencia a más de dos antifímicos es de 2.5%, correspondiendo a pacientes con grave deterioro clínico, quienes han recibido el tratamiento corto y han sufrido altas prematuras a su control y seguimiento clínico, todo esto aunado a factores sociales adversos intercurrentes (Said-Fernández et al., 2001).

Para enero de 1995, el 9.5% del total de pacientes fueron casos con más de tres años de estancia en el programa de control de la tuberculosis de la UMF No. 28.

HIPÓTESIS

En la población de la UMF No. 28 del IMSS, existe asociación entre la susceptibilidad a TbP y la presencia de antígenos HLA-DR y –DQ.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la asociación de los antígenos HLA-DR y -DQ con TbP en población derechohabiente de la UMF No. 28 con diagnóstico de TbP.

Objetivos específicos

1. Estimar las frecuencias génicas de los antígenos HLA clase II (-DR y –DQ), para los grupos: “enfermos con TbP” y “testigos sanos”.

2. Estudiar si las frecuencias génicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

3. Estimar el grado de asociación entre la presencia de los antígenos HLA clase II (-DR y -DQ) y la susceptibilidad o resistencia a tuberculosis pulmonar del paciente.

4. Estimar el riesgo relativo para los antígenos HLA clase II (-DR y -DQ).

5. Comparar los perfiles genéticos de los haplotipos HLA-DR/HLA-DQ entre los grupos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de la población y el diseño de muestreo

Se realizó un estudio de Caso-Control no pareado en población derechohabiente de la Unidad de Medicina Familiar No. 28 del IMSS. Se integraron dos grupos: a) un grupo de 50 personas con tuberculosis pulmonar y b) un segundo grupo de 417 personas sanas (Anexo 1).

3.1.1 Grupo de enfermos con tuberculosis pulmonar

La población derechohabiente que participó en el proyecto integrando el grupo “enfermos con TbP” fue diagnosticada por los médicos familiares y canalizada por el médico especialista en Epidemiología de esta clínica. El número de individuos participantes en el estudio se determinó mediante un muestreo no probabilístico (por casos consecutivos) en un período de un año (Velasco-Rodríguez et al., 2003).

El estudio se desarrolló por entrevista personal a 50 personas de uno u otro sexo, con diagnóstico clínico de TbP, a quienes se les pidió que contestaran una encuesta, ya fuera en el departamento de Medicina Preventiva de la propia clínica o en sus domicilios. La encuesta aplicada incluyó datos acerca de su edad, ocupación, ingreso familiar, domicilio, lugar de nacimiento del entrevistado y sus cuatro abuelos, antecedentes personales y heredo-familiares de padecimiento de tuberculosis pulmonar y/o de resistencia al tratamiento y fecha inicial de diagnóstico.

3.1.1.1 Criterios de inclusión

En este grupo se incluyeron derechohabientes de la UMF No. 28 del IMSS, susceptibles a TbP. Definimos como susceptibles a todos los pacientes con

diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Es decir, pacientes de uno u otro sexo, sin importar la edad, con imagen radiológica sugestiva de TbP, baciloscopía positiva (presencia de BAAR en los extendidos de esputo) y cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

3.1.1.2 Criterios de exclusión

Los pacientes que fueron excluidos de este estudio, fueron aquellos que tuvieron una o varias de las siguientes características:

a) Parentesco del candidato a participante con otro paciente incluido en este grupo.
b) Cultivo negativo para micobacterias del complejo de la tuberculosis.
c) SIDA.
d) Tratamiento con drogas inmunosupresoras.
e) Pacientes que no aceptaron participar en el proyecto.

3.1.2 Grupo de testigos sanos

Los integrantes del grupo testigos sanos fueron seleccionados de la población sana candidata a donación renal que acude al Hospital de Especialidades No. 25 del IMSS, en esta ciudad.

El método de selección fue probabilístico aleatorio simple (Velasco-Rodríguez et al., 2003). El número de individuos participantes se calculó de acuerdo a Chakraborty et al (1991). Ellos diseñaron un modelo aplicable para grandes polimorfismos (como lo es el HLA), que toma en cuenta la heterocigocidad, la que es obtenida según la fórmula $h = 1 - \sum p_i^2$. El siguiente es un ejemplo de cálculo de heterocigocidad para el sistema ABO, suponiendo las frecuencias génicas: A=0.2, B=0.2 y O=0.6:

$$h = 1 - \left[(0.2)^2 + (0.2)^2 + (0.6)^2 \right] = 1 - [0.04 + 0.04 + 0.36] = 1 - 0.44 = 0.56$$

$$h = 0.56$$

Chakraborty et al. (1991), proponen un tamaño de muestra de 162 individuos para el locus ApoC-II con una heterocigocidad de 85.9% y para el locus ApoB con una heterocigocidad de 76.9% proponen una muestra de 240 individuos. La heterocigocidad estimada para HLA-DR fue de 86.4% y para HLA-DQ de 82%, por lo que un tamaño de muestra de 417 en el presente trabajo, es casi el doble del mínimo requerido.

3.2 Análisis de laboratorio

3.2.1 Cultivo de micobacterias

El diagnóstico clínico en el grupo “Enfermos con TbP” se confirmó por cultivo e identificación de *M. tuberculosis* (a partir de esputo) en medio de Lowenstein Jensen-Holm a 37ºC, el que se incubó de 4 a 8 semanas (Strong y Kubica, 1981; Master, 1994) y se determinó su perfil de resistencia a medicamentos antifímicos de primera línea mediante el sistema radiométrico Bactec 460 (Siddigi, 1996). Estos estudios se llevaron a cabo por el personal del laboratorio de Micobacteriología del CIBIN.

3.2.2 Tipificación para los antígenos HLA clase II

A pacientes y testigos se les extrajeron 10 ml de sangre con anticoagulante ACD (citrato, ácido cítrico, dextrosa). Las muestras se procesaron inmediatamente después de la extracción en el laboratorio de Histocompatibilidad del Hospital de Especialidades No. 25 del IMSS, donde se llevó a cabo la tipificación para los antígenos HLA clase II.

El aislamiento de los linfocitos B, necesario para la tipificación de antígenos HLA clase II, se llevó a cabo a partir de la muestra sanguínea mediante la técnica de perlas inmunomagnéticas (inmunoperlas) [ver el fundamento de esta técnica en Antecedentes (Gorodezky, 1997)].

2.2.2.1 Aislamiento de linfocitos B. Técnica de perlas inmunomagnéticas

Las perlas imunomagnéticas se unen específicamente a los linfocitos B y una vez formados los complejos CD29/anti-CD29, se aplica un campo magnético para separar a las células unidas a las perlas inmunomagnéticas del resto. Esta técnica implicó los siguientes pasos (Gorodezky, 1997):

a) Colección de la muestra**.** Se obtuvieron aproximadamente 10 ml de sangre venosa en tubo vacutainer con anticoagulante ACD (ácido cítrico dextrosa). Las células B deben ser aisladas dentro de las 24 horas siguientes para lograr un mayor rendimiento. Los tubos se mantuvieron en posición horizontal a 20-25ºC hasta su uso.
b) Aislamiento de linfocitos B.
    a. La sangre completa se centrifugó por 10 min a 400-900 × *g*.
    b. Se transfirió aproximadamente 1 ml de la capa blanca esponjosa sobrenadante a un tubo de 5 ml.
    c. Se agregaron 4 ml de amortiguador salino de fosfatos PBS (Phosphate Buffered Saline)/citrato (1X) deficiente en sales de Ca^{++} y Mg^{++}, pH 7.4, (Molaridad (10X): Na_2HPO_4 0.081, K_2HPO_4 0.015).
    d. El frasco que contiene las inmunoperlas se agitó con vórtex aproximadamente 10 seg. para resuspenderlas inmediatamente antes de usarlas.
    e. Se agregaron 100 μl de inmunoperlas a la muestra de prueba. Se tapó el tubo inmediatamente después y se agitó por inversión, 2-3 veces, para dispersar las perlas magnéticas.
    f. El tubo se hizo rotar manualmente por 1 min a 20-25 ºC para permitir que las perlas se unieran a las células B.

g. El tubo se destapó y se colocó en un separador magnético por 1 min.
h. Se removió y descartó el sobrenadante con una pipeta desechable. Se retiró el tubo del separador magnético.
i. Se resuspendieron las inmunoperlas (con las células B adheridas) con 2.5 ml de PBS/citrato, golpeando suavemente el fondo del tubo para dispersarlas. Se colocó de nuevo el tubo en el separador magnético por 1 min. Se descartó el sobrenadante. Esta operación se repitió dos veces.
j. Se resuspendieron las inmunoperlas (con las células B adheridas) en 0.5 ml de buffer PBS/citrato.

c) Verificación de la concentración celular adecuada***.*** Para ajustar la concentración celular:
   a. Se agregó 1 μl de la suspensión de inmunoperlas obtenida en el paso anterior (con las células B adheridas) a un pozo de una placa Terasaki sin reactivos.
   b. A cada pozo de la placa de prueba, se agregaron 5 μl de FluoroQuench™ AO/EB (Staining/Quench Reagent FQ Acridine Orange/Ethidium Bromide (Cat. FQAE-500)), colorante fluorescente supravital el cual contiene Naranja de Acridina, Bromuro de Etidio y tinta china para tinción y EDTA como fijador.
   c. Se revisó la viabilidad de las células observando las células vivas con un microscopio de fluorescencia (fluorescen en color verde) de acuerdo al procedimiento de Vartdal et al., 1986. Se ajustó la cuenta celular a una concentración de 2×10^6 células/ml (2,000 células por pozo).

2.2.2.2 *Técnica* de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento

Una vez obtenida la suspensión de linfocitos B a una concentración adecuada, ésta se utilizó para detectar los antígenos HLA clase II, mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (Terasaki y McClelland, 1964). Para realizar esta técnica se utilizaron placas Terasaki HLA

clase II, (Terasaki HLA Tissue Typing Trays, Laboratorio One Lambda, Inc., California, EE.UU).

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo a los siguientes pasos:

a) Se descongeló una placa de Terasaki a 20-25ºC por 15 minutos y se utilizó antes de los siguientes 30 min. Cada placa tiene 72 pozos, cada pozo conteniendo 1 μl de uno de los diversos antisueros con anticuerpos monoclonales monoespecíficos y multiespecíficos necesarios para detectar antígenos HLA clase II y 5 μl de aceite mineral para evitar la evaporación (Gorodezky, 1997).
b) A cada pozo de la placa Terasaki Se agregó 1 μl de suspensión de linfocitos B aislados previamente (2 x 10^6 células/ml). Cada placa normalmente contiene un control positivo, el que consiste de un anticuerpo monoclonal fuertemente citotóxico para linfocitos B y un control negativo, que proviene de un hombre sano de tipo sanguíneo AB sin reactividad citotóxica en pruebas con linfocitos de donadores al azar. También incluye un control anti-linfocitos T y otro anti-granulocitos, que sirven para saber si se aislaron únicamente linfocitos B (Terasaki y McClelland, 1964), por lo que los linfocitos B aislados no deben tener reactividad con ellos.
c) Las placas se colocaron durante 5 minutos en un agitador mecánico para que se mezclaran las microgotas.
d) Posteriormente, las placas se incubaron a 20-25ºC por 30 min.
e) Se dispensaron 5μl del complemento de conejo clase II (especial para determinar antígenos HLA-DR) a cada pozo de la placa de prueba.
f) Las placas se incubaron de nuevo a 20-25ºC por 1 h.
g) Se agregaron 5μl de FluoroQuench™ AO/EB.
h) Las placas se dejaron reposar a 20-25ºC por 15 min. para permitir que los linfocitos se sedimentaran.
i) Las placas se leyeron en microscopio invertido de luz fluorescente, observándose las células teñidas: en una reacción positiva es evidente observar la muerte celular (las células muertas fluorescen en color rojo) y en

una reacción negativa observar las células vivas (fluorescen en color verde) como indican Vartdal et al., 1986.

j) La reacción positiva se valoró estimando el porcentaje de muerte celular (Gorodezky, 1997) y de acuerdo a la lectura estándar establecida por la ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics), la que se especifica en el cuadro No. 2. Si el control negativo contenía algunos linfocitos muertos, el porcentaje de muerte celular en los pozos restantes tenía que ser ajustada de acuerdo con la muerte celular observada en el control negativo (Gorodezky, 1997).

Cuadro 2. Lectura estándar establecida por la ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) según Gorodezky (1997).

Valor	**% de muerte celular**	**Interpretación**
1	0-10%	Negativo
2	11-20%	Negativo dudoso
4	21-50%	Positivo débil
6	51-80%	Positivo
8	81-100%	Positivo fuerte
0		No lectura

Una vez obtenidos los datos con el trabajo arriba descrito, se procedió a llevar a cabo su análisis estadístico.

2.3 Análisis estadístico de la información

Los datos obtenidos mediante la tipificación serológica de los antígenos HLA de ambos grupos “Enfermos con TbP” y “Testigos Sanos”, fueron capturados mediante el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences ver. 12.0). Se realizó un estudio de la estructura genética de ambos grupos, utilizando el programa Arlequín versión 2.0. El nivel de significancia considerado para todas las pruebas fue 0.05 (Schneider et al., 1997).

A nivel intrapoblacional se estimaron las frecuencias alélicas, haplotípicas en fase desconocida (5,000 permutaciones), la prueba de desequilibrio de ligamiento (10,000 permutaciones). la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de 10,000 pasos en la cadena de Markov y la prueba de asociación en el nivel de locus (Schneider et al., 1997).

Respecto a los alelos incrementados en una o en otra población, el nivel de significancia y el RR se estimó por medio del programa Epi’s Odds (Flandre y Morabia, 1989).

Los genotipos de la muestra de “Enfermos con TbP” se compararon contra la de “testigos sanos” por medio de la prueba estadística de FST para distancias por pares entre poblaciones permitiendo 1,000 permutaciones para la prueba de Mantel y 100 permutaciones para significancia, y la prueba exacta para diferenciación de poblaciones pudiendo alcanzar los 10,000 pasos en cadena de Markov (Schneider et al., 1997).

IV. RESULTADOS

En el cuadro 3 se presentan los datos sociodemográficos de la población con TbP estudiada en el presente trabajo. En este cuadro se describe a la población de acuerdo con algunos factores que han sido considerados como de riesgo para desarrollar esta enfermedad.

Como se puede observar, la población en estudio es originaria en un 44% del Noreste de México, el 56% nació en otros estados de la República Mexicana. El 7.5% es analfabeta y un 52.5% sólo terminó la educación primaria. El 69.44% tiene ingresos de 1 a 3 salarios mínimos. El 26% vive en condiciones de hacinamiento. El 50% consume alcohol. El 48% fuma. El 12% consume drogas.

Cuadro 3.- Descripción de la población de enfermos con tuberculosis pulmonar. Factores sociodemográficos.

Variable	**Categoría**	**Frecuencia**	**Porciento**
Sexo	Hombres	31	62.00
	Mujeres	19	38.00
Lugar de nacimiento del paciente	Nuevo León	16	32.00
	Coahuila y Tamaulipas	6	12.00
	Otros Estados	28	56.00
Escolaridad	Analfabeta	3	7.50
	Primaria	21	52.50
	Secundaria	9	22.50
	Preparatoria o Técnico	5	12.50
	Profesionista	2	5.00
	No hay dato	10	
Ingreso mensual	Hasta 1 salario mínimo	8	22.22
	2 a 3 salarios mínimos	17	47.22
	Hasta 4 salarios mínimos	4	11.11
	Más de 5 salarios mínimos	7	19.45
	No hay dato	14	
Hacinamiento	Positivo	11	26.19
	Negativo	31	73.81
	No hay dato	8	
Consumo de Alcohol	Positivo	15	50.00
	Negativo	15	50.00
	No hay dato	20	
Uso de drogas	Positivo	3	12.00
	Negativo	22	88.00
	No hay dato	25	
Tabaquismo	Positivo	14	48.28
	Negativo	15	51.72
	No hay dato	21	

La edad del paciente (Cuadro 4), fluctuó en un rango de 17 a 72 años, con una media de 45 años ± 17. Estos datos se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, encontrándose que no existen diferencias por intervalo de edad.

Cuadro 4.- Distribución de edades del grupo enfermos con tuberculosis pulmonar.

Edad	**<20**	**20-29**	**30-39**	**40-49**	**50-59**	**60-69**	**70-79**	**Total**
Frecuencias observadas	4	8	4	6	9	8	3	42
Frecuencias esperadas	6	6	6	6	6	6	6	42

$X^2_{K\text{-}S}$ = 0.693, g. l. = 6, P = 0.723.

Los factores fisiopatológicos de la tuberculosis de la población en estudio, se presentan en el cuadro 5. El 38.10% tuvo contacto conocido con algún paciente con TbP (Combe positivo), sólo el 23.33 refirió contacto con un familiar con TbP, el 40% tuvo antecedente de haber padecido tuberculosis, el 87% de los pacientes presentaron pérdida de peso, el 17.95% tuvo algún otro síntoma sugerente de la enfermedad y el 37.93 padece diabetes mellitus tipo 2.

En el cuadro 6 se presentan las frecuencias génicas para HLA-DR y HLA-DQ. Las diferencias estadísticas correspondientes entre las frecuencias del grupo enfermos con TbP y testigos sanos, se presentan en los cuadros 7, 8 y 9.

Las frecuencias alélicas para HLA-DR, se presentan en el cuadro 7. En este cuadro se puede observar que las frecuencias alélicas HLA-DR que se encontraron incrementadas significativamente ($P<0.05$) en enfermos con TbP con respecto a testigos sanos, fueron: DR11(5) con un RR de 2.01, DR16(2) con un RR de 5.06. En el grupo testigos sanos con respecto a enfermos con TbP se encontró incrementado el alelo DR17(3) cuyo valor de RR fue de 0.12.

Cuadro 5.- Descripción de la población de enfermos con tuberculosis pulmonar. Factores fisiopatológicos.

Variable	**Categoría**	**Frecuencia**	**Porciento**
Aplicación de BCG	Positivo	23	58.97
	Negativo	16	41.03
	No hay dato	11	
Combe	Positivo	16	38.10
	Negativo	26	61.90
	No hay dato	8	
Familiares con tuberculosis	Positivo	7	23.33
	Ninguno	23	76.67
	No hay dato	20	
Antecedentes de Tuberculosis	Positivo	16	40.00
	Negativo	24	60.00
	No hay dato	10	
Pérdida de peso	< del 10%	16	40.00
	> del 10%	15	37.50
	Se ignora el %	4	10.00
	Negativo	5	12.50
	No hay dato	10	
Otros síntomas sugestivos de TbP	Positivo	7	17.95
	Negativo	32	82.05
	No hay dato	11	
Diabetes mellitus tipo 2	Positivo	11	37.93
	Negativo	18	62.07
	No hay dato	21	

Cuadro 6. Frecuencias génicas estimadas para los loci HLA-DR y –DQ en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos.

Alelo HLA	Testigos sanos	Enfermos con TbP
DR1	0.07314	0.04000
DR10	0.00719	0.00000
DR103	0.01079	0.00000
DR11	0.06355	0.12000
DR12	0.02038	0.01000
DR13	0.07314	0.07000
DR14	0.05755	0.10000
DR15	0.09472	0.04000
DR16	0.01918	0.09000
DR17	0.07914	0.01000
DR18	0.00719	0.01000
DR4	0.27818	0.25000
DR7	0.06235	0.10000
DR8	0.14149	0.15000
DR9	0.01199	0.01000
Número total de alelos DR	15	13
DQ2	0.15468	0.11000
DQ4	0.14508	0.19000
DQ5	0.11511	0.11000
DQ6	0.15108	0.14000
DQ7	0.27578	0.41000
DQ8	0.14988	0.03000
DQ9	0.00839	0.01000
Número total de alelos DQ	7	7

Cuadro 7. Frecuencias alélicas estimadas para el locus HLA-DR (con diferencia significativa) en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos.

Alelo HLA	Testigos Sanos		Enfermos con TbP	
	n=417	Frecuencia	n=50	Frecuencia
DR11(5)	53	0.06355	12	0.12000[1]
DR16(2)	16	0.01918	9	0.09000[2]
DR17(3)	66	0.07914[3]	1	0.01000
Número total de alelos	15		13	

[1] X^2 = 3.57, g.l. = 1, RR = 2.01 (1.03;3.90).
[2] X^2 = 14.58, g.l. = 1, RR = 5.06 (2.17;11.77).
[3] X^2 = 5.41, g.l. = 1, RR = 0.12 (0.02;0.86).

En el cuadro 8 se pueden observar las frecuencias estimadas para HLA-DQ. En el grupo enfermos con TbP, se encontró incrementada la frecuencia del alelo DQ7(3) con respecto a testigos sanos, con un RR de 1.82 y en testigos sanos, el alelo DQ8(3) con respecto a enfermos con TbP, con un RR de 0.18.

Cuadro 8. Frecuencias alélicas estimadas para el locus HLA-DQ (con diferencia significativa) en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos.

Alelo HLA	**Testigos Sanos**		**Enfermos con TbP**	
	n=417	Frecuencia	n=50	Frecuencia
DQ7(3)	230	0.27578	41	0.41000[1]
DQ8(3)	125	0.14988[2]	3	0.03000
Número total de alelos	7		7	

[1] X^2 = 7.17, g.l. = 1, RR = 1.82 (1.19;2.80).
[2] X^2 = 9.86, g.l. = 1, RR = 0.18 (0.05;0.56).

Los haplotipos HLA-DR/DQ se presentan en el cuadro 9. Los haplotipos que se encontraron incrementados en enfermos con TbP con respecto a testigos sanos fueron: /DR11(5)-DQ7(3) con un RR de 2.27, /DR14(6) -DQ5(1) que presenta un RR de 19.67, /DR16(2)-DQ5(1) con un RR de 4.37, /DR16(2)-DQ6(1) para el que se estimó un RR de 8.65, /DR16(2)-DQ7(3) con un RR de 4.45 y /DR4-DQ4 con un RR de 3.94.

Los antígenos HLA-DR incrementados en enfermos con TbP únicamente en forma haplotípica (en asociación con otro antígeno HLA-DQ), fueron el DR14(6) y el DR4. Los antígenos HLA-DQ incrementados en pacientes únicamente en forma haplotípica (en asociación con otro antígeno HLA-DR), fueron el DQ4, DQ5(1) y el DQ6(1).

A su vez, los haplotipos que se encontraron incrementados en el grupo testigos sanos fueron: /DR17(3) -DQ2 con un RR de 0.11 y el /DR4-DQ8(3) que presentó un RR de 0.15.

En este mismo grupo, se encontró sólo un antígeno HLA-DR incrementado únicamente en forma haplotípica, éste fue el DR4. El antígeno HLA-DQ que se encontró incrementado en el grupo testigos sanos únicamente en forma haplotípica, fue el DQ2.

Al comparar los grupos enfermos con TbP y testigos sanos (mismo cuadro No. 9) por medio del programa Arlequín y Episode, se encontró una F_{ST} de 0.01152 altamente significativa (P = 0.00901) lo que nos indica que son diferentes. Para ambos, el sistema HLA se encontró en desequilibrio de ligamiento (P = 0.000001). Respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, ambos grupos se encontraron en equilibrio.

Cuadro 9.- Frecuencias haplotípicas HLA-DR/-DQ estimadas (con diferencia significativa) en enfermos con tuberculosis pulmonar y testigos sanos.

Haplotipo	**Testigos Sanos**		**Enfermos con TbP**	
	n=417	Frecuencia	n=50	Frecuencia
DR11 DQ7	46	0.05628	11	0.10968[1]
DR14 DQ5	4	0.00959	8	0.04000[2]
DR16 DQ5	6	0.00814	3	0.03000[3]
DR16 DQ6	2	0.00178	2	0.02000[4]
DR16 DQ7	8	0.00927	4	0.03810[5]
DR17 DQ2	65	0.07793	1	0.01000[6]
DR4 DQ4	9	0.00962	4	0.03857[7]
DR4 DQ8	125	0.14988	3	0.03000[8]
X^2 desequilibrio de ligamiento		1701.45361		163.73788
Valor de Probabilidad		0.000001		0.000001
Grados de libertad		84		72
No. total de haplotipos posibles		89		52

[1] X^2 = 4.04, g.l. = 1, RR = 2.27 (1.09;4.75).
[2] X^2 = 34.56, g.l. = 1, RR = 19.67 (5.68;68.06).
[3] X^2 = 2.80, g.l. = 1, RR = 4.37 (1.06;18.06).
[4] X^2 = 3.03, g.l. = 1, RR = 8.65 (1.19;62.79).
[5] X^2 = 4.39, g.l. = 1, RR = 4.45 (1.29;15.34).
[6] X^2 = 5.72, g.l. = 1, RR = 0.11 (0.01;0.81).
[7] X^2 = 3.68, g.l. = 1, RR = 3.94 (1.17;13.31).
[8] X^2 = 11.72, g.l. = 1, RR = 0.15 (0.05;0.49).

V. DISCUSIÓN

El hecho de haber encontrado que la distribución de edades del grupo “enfermos con TbP” fue uniforme, difiere de lo establecido por Mandell et al. (1991) quienes consideraban principalmente a los niños y los ancianos como los más afectados. Este hecho contribuye a elevar el costo social y económico de la tuberculosis, pues involucra a la población en edad productiva que es la que se incapacita laboralmente. Aunado a esto, para el IMSS la TbP representa, sólo en gastos directos, un gasto anual de más de siete millones de pesos y una tasa de 0.9 años de vida saludable (AVISA) perdidos por cada 1000 habitantes, es decir, 15,532.61 AVISA (Said-Fernández et al., 2001).

Respecto a los demás factores de riesgo, los resultados obtenidos están de acuerdo a lo establecido en la literatura por Kumate y Gutiérrez (1980), Alcaide et al. (1996) y Hopewell (1994) para los siguientes: hacinamiento, tabaquismo, alcoholismo y drogadicción; aunque los tres últimos fueron los que presentaron un mayor porcentaje de datos perdidos, pues en las encuestas no se obtuvo el dato. De acuerdo con Styblo et al. (1967), para combe positivo. Con Hopewell (1994) para diabetes mellitus. Están de acuerdo también con Mandell et al. (1991), en cuanto a inmigración, pobreza (y por lo tanto, baja escolaridad), pues todos ellos se encontraron presentes en la población en estudio en porcentajes altos.

En los artículos más recientes sobre asociación de HLA con TbP, los antígenos del sistema HLA se tipifican por técnicas de biología molecular. Para la discusión de los resultados del presente trabajo, se ha tomado en cuenta la especificidad serológica correspondiente al alelo tipificado a nivel molecular.

El haber encontrado al alelo HLA-DR16(2) incrementado significativamente en “enfermos con TbP” con respecto a “testigos sanos” ($P<0.05$), concuerda con lo mencionado por Mehra et al., (1991), Dubaniewicz (2000) y Liu et al., (2004) y con otros autores [Chukanova et al., (1995); Khomenko et al., (1990); Fedoseeva et al.,

(1993); Dovgaliuk et al., (1995); Brahmajothi et al., (1991); Singh et al., (1983); Singh et al., (1983); Bothamley et al., (1989); Mehra et al., (1986) y Sriram (2001)] con respecto a su antígeno paterno HLA-DR2.

Los resultados respecto al antígeno DR11(5), incrementado en enfermos con TbP con respecto a testigos sanos, están de acuerdo con Dovgaliuk et al., (1995), respecto a su antígeno paterno DR5.

Este es el primer trabajo en que se encuentra al antígeno DQ7(3) asociado a tuberculosis, éste no se había informado anteriormente, tampoco su antígeno paterno DQ3.

Respecto a los haplotipos HLA-DR/-DQ en asociación con TbP, no se encontró concordancia con lo informado por Mehra et al., (1995) y Ravikumar et al., (1999), esto quizá se deba a que son los únicos que informan sobre un haplotipo asociado, pues en la mayoría de los trabajos se ha estudiado la asociación TbP-HLA sólo a nivel de alelo, no en forma haplotípica. En los haplotipos /DR11(5)-DQ7(3), /DR16(2)-DQ5(1), /DR16(2)-DQ6(1), /DR16(2)-DQ7(3) encontrados asociados con TbP en el presente trabajo, puede observarse que intervienen antígenos para los cuales también se encontró asociación con TbP a nivel de alelo, además de que en uno de dichos haplotipos se encuentra a DQ5(1), lo que está de acuerdo con Terán-Escandón et al., (1999) a nivel de alelo y DQ6(1) que aunque no ha sido asociado a tuberculosis pulmonar, LeBlanc et al., (2000) lo han asociado al complejo *M. avium* diseminado en pacientes con SIDA, pero únicamente debido a que está cercanamente ligado a DR15(2), antígeno que en este trabajo no se encontró asociado a TbP.

En este trabajo, el alelo DR16(2) se encontró asociado a TbP con un RR de 5.06, mientras que en forma haplotípica asociado a DQ6(1) (/DR16(2)-DQ6(1)) el RR se incrementa a 8.65; es posible que ambos (DR16(2) y -DQ6(1)) contribuyan

a una presentación deficiente de los antígenos de *M. tuberculosis* a los linfocitos T CD4+ y la respuesta inmune no sea adecuada y por lo tanto, el RR es más alto.

Respecto a los haplotipos /DR14(6)-DQ5(1), y /DR4-DQ4 en los que ambos antígenos HLA-DR y –DQ no se encontraron asociados a TbP a nivel alelo, el hecho de encontrarlos asociados a TbP a nivel de haplotipo, podría atribuirse a que la presentación de los antígenos de *M. tuberculosis* por ambas moléculas HLA no es lo suficientemente adecuada, ya que en uno de dichos haplotipos se encuentra DQ5(1) lo que, como se dijo antes, está de acuerdo a nivel alélico con Terán-Escandón et al., (1999).

El haber encontrado al alelo DR17(3) en asociación negativa, indicando protección contra TbP en este grupo, está de acuerdo con lo informado por Cox et al., (1988) para DR3 como antígeno paterno de DR17(3).

Respecto a los haplotipos /DR17(3)-DQ2 y /DR4-DQ8(3), los resultados sólo concuerdan con lo informado a nivel alélico, pues no han sido informados haplotipos en asociación negativa a TbP, por lo que sólo se puede observar su concordancia con otros autores a nivel alélico. Además de DR17(3) discutido en el párrafo anterior, está de acuerdo a lo informado a nivel alélico por Bothamley et al., (1989), respecto a DQ3, antígeno paterno de DQ8.

Los resultados que indican que ambos grupos, E y TS, están en equilibrio de Hardy Weinberg, concuerda con Cerda-Flores et al., (1987).

El haber encontrado a ambos grupos (E y TS) en desequilibrio de ligamiento, está de acuerdo con Ziegler et al., (1991), y con Janeway (1996).

El haber encontrado que ambos grupos (E y TS) tienen una estructura genética diferente, sugiere que la diferencia entre ambos grupos es debida al menos en parte al sistema HLA y que estos antígenos juegan un papel importante en la fisiopatología de la tuberculosis.

VI. IMPLICACIONES Y PERSPECTIVAS

El hecho de haber encontrado algunos antígenos del sistema HLA asociados con tuberculosis pulmonar activa en la población de la UMF No. 28, además de contribuir al conocimiento de la fisiopatología de la tuberculosis pulmonar, podría contribuir, mediante la tipificación de antígenos HLA, al pronóstico de los casos nuevos encontrados y asesoramiento genético en medicina preventiva para los pacientes que están bajo riesgo de contraer esta enfermedad, ya que aquellos portadores de los antígenos asociados a TbP serían objeto de un tratamiento personalizado y se tomarían medidas preventivas para aquellos contactos sanos (familiares y no familiares).

En un futuro, será posible tipificar a nivel molecular los antígenos HLA encontrados asociados a TbP, ya que durante el muestreo se formó un banco de DNA de los pacientes con TbP. Con esto se podría conocer si en esta población existen algunos alelos HLA específicos que correlacionan con tuberculosis fulminante.

Siendo la tuberculosis una enfermedad multifactorial, con el banco de DNA disponible, será posible realizar una investigación en el genoma de estos pacientes con TbP para identificar otros genes independientes del HLA que han sido propuestos como candidatos para conferir susceptibilidad o resistencia a TbP.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la búsqueda de asociación del sistema HLA con tuberculosis pulmonar en la población de la UMF28, indican que los antígenos HLA clase II: DR11(5), DR16(2) y DQ7(3) están asociados a una alta susceptibilidad a TbP, por lo que se apoya la hipótesis propuesta.

En esta población la alta susceptibilidad asociada a HLA, puede atribuirse quizá en forma más importante a los haplotipos /DR11(5)-DQ7(3), /DR14(6) -DQ5(1), /DR16(2)-DQ5(1), /DR16(2)-DQ6(1), /DR16(2)-DQ7(3) y /DR4-DQ4 en los que la asociación de ambos antígenos HLA-DR y -DQ ha contribuido a los riesgos relativos más altos.

Algunos antígenos HLA asociados a TbP únicamente en forma haplotípica: /DR14(6)-DQ5(1) y /DR4-DQ4, contribuyen en forma importante a la alta susceptibilidad a desarrollar tuberculosis activa, siendo el primero el de mayor RR.

Los antígenos HLA-DR asociados a TbP únicamente en forma haplotípica, fueron DR14, DR4, DQ4, DQ5(1) y DQ6(1).

El antígeno DR17(3) y los haplotipos /DR17(3)-DQ2 y /DR4-DQ8(3) sugieren una asociación con protección o resistencia a TbP.

Los enfermos con TbP y la población sana, tienen una estructura genética diferente.

ANEXO 1

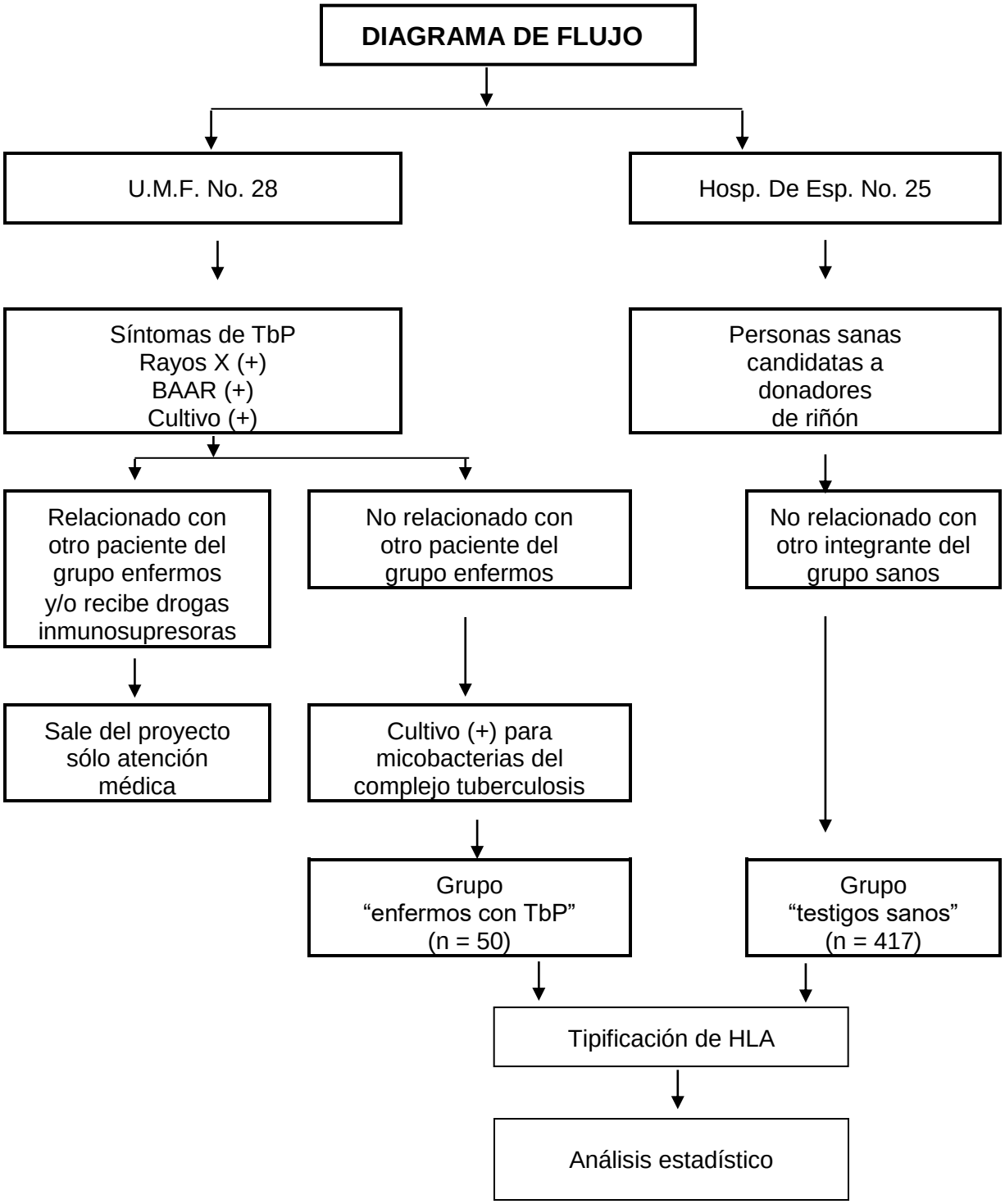
DIAGRAMA DE FLUJO
U.M.F. No. 28
Hosp. De Esp. No. 25
Síntomas de TbP
Rayos X (+)
BAAR (+)
Cultivo (+)
Personas sanas candidatas a donadores de riñón
Relacionado con otro paciente del grupo enfermos y/o recibe drogas inmunosupresoras
No relacionado con otro paciente del grupo enfermos
No relacionado con otro integrante del grupo sanos
Sale del proyecto sólo atención médica
Cultivo (+) para micobacterias del complejo tuberculosis
Grupo "enfermos con TbP" (n = 50)
Grupo "testigos sanos" (n = 417)
Tipificación de HLA
Análisis estadístico

ANEXO 2

PUBLICACIONES

Rojas-Alvarado M de los A., S. Said-Fernández, L. Navarro-Marmolejo, P. Becerril-Montes, ML. Díaz-Mendoza, G. Caballero-Olín, J. Verde-Star, S. Valdovinos-Chávez, R. Foroughbackhch-P, M. Morales-Vallarta, H. Martínez-Rodríguez, RM. Cerda-Flores, 2004. Estructura Genética de las poblaciones con y sin tuberculosis pulmonar en el Noreste de México, basados en el sistema HLA. Rev Inv Clin 56:833-834.

Rojas-Alvarado M de los A., S. Said-Fernández, L. Navarro-Marmolejo, P. Becerril-Montes, G. Caballero-Olín, RM. Cerda-Flores, 2004. El apellido, un posible indicador de la alta prevalencia de tuberculosis en Monterrey. Rev Inv Clin 56:834-835.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Altamirano G., 1992. Inmunología de las Mucosas. Distribuidora y Editora Mexicana, S.A. de C.V. México.

Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, JD. Watson, 1994. Chapter 23. The immune system. In Molecular Biology of the Cell. Third Edition. Garland Publishing Inc. New York. pp. 1195-1254.

Alcaide J., MN. Altet, P. Plans, I. Parron, L. Folguera, E. Salto, A. Dominguez, H. Pardell, L. Salleras, 1996. Cigarette smoking as a risk factor for tuberculosis in young adults: a case-control study. Tuber Lung Dis 77:112-6.

Blackwell J., 1989. The macrophague resistance gen (Lsh/Ity/Bcg. Res Immunol 140:767-828.

Blackwell JM., CH. Barton, JK. White, S. Searle, AM. Baker, H. Williams, MA. Shaw, 1995. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region. Mol Med 1:194-205.

Bloom BR., CJL. Murray, 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science 257:1055-1064.

Bodmer JG., SG. Marsh, ED. Albert, WF. Bodmer, RE. Bontrop, D. Charron, B. Dupont, HA. Erlich, R. Fauchet, B. Mach, WR. Mayr, P. Parham, T. Sasazuki, GM. Schreuder, JL. Strominger, A. Svejgaard, PI. Terasaki, 1997. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Tissue Antigens 49:297-321.

Bothamley GH., JS. Beck, GM. Schreuder, JD. Amaro, RR. de Vries, T. Kardjito, J. Ivanyi, 1989. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. J Infect Dis 159:549-55.

Bothamley GH., GMT. Schreuder, 1992. Human leukocyte antigen, tuberculosis, and *Mycobacterium tuberculosis*-specific antibody. J Infect Dis 165:598.

Bothamley GH., JH. Gibbs, JS. Beck, GM. Schreuder, RR. de Vries, JM. Grange, J. Ivanyi, T. Kardkjito, 1995. Delayed hypersensitivity and HLA in smear-positive pulmonary tuberculosis. Int Arch Allergy Immunol 106:38-45.

Brahmajothi V., RM. Pithcappan, VN. Kakkanaiah, M. Sashidhar, K. Rajaram, S. Ramu, K. Palanimurugan, CN. Paramasivan, R. Prabhakar, 1991. Association of pulmonary tuberculosis and HLA in South India. Tubercle 72:123-32.

Brudney K., J. Dobkin, 1991. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. Am Rev Respir Dis 144:745-749.

Bryan CF., KM. Harrell, PW. Nelson, GE. Pierce, G. Ross, CF. Shield, BA. Warady, MI. Aeder, TS. Helling, MD. Landreneau, AM. Luger, 1996. HLA-DR and DQ typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primer mixes reduces the incidence of phenotypic homozygosity (blanks) over serology. Transplantation 62:1819-24.

Centers for Disease Control, 1993. Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortality MMWR 42(49): 961-64.

Cerda-Flores RM., E. Ramírez-Fernández, R. Garza-Chapa, 1987. Genetic admixture and distances between populations from Monterrey, Nuevo León, México, and their putative ancestral populations. Hum Biol 59:31-49.

Cerda-Flores RM., GK. Kshatriya, SA. Barton, CH. Leal-Garza, R. Garza-Chapa, WJ. Schull, R Chakraborty, 1991. Genetic structure of the populations migrating from San Luis Potosí and Zacatecas to Nuevo León in México. Hum Biol 63:309-327.

Comstock GW., 1978. Tuberculosis in twins: a reanalysis of the Prophit survey. Am Rev Resp Dis 117:621.

Cox RA., M. Downs, RE. Neimes, AJ. Ognibene, TS. Yamashita, JJ. Ellner, 1988. Immunogenetic analysis of human tuberculosis. J Infect Dis 158:1302-8.

Chakraborty R., M. Fornage, R. Gueguen, E. Boerwinkle, 1991. Population genetics of hypervariable loci: analysis of PCR based VNTR polymorphism within a population. DNA fingerprinting approaches and applications. Ed. T. Burke, G. Dolf, AJ Jeffreys y R Wolfl. Birkhauser Verlag Basel. Switzerland.

Chan J., SHE. Kaufmann, 1994. Immune Mechanisms of Protection. En: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Editado por Barry R. Bloom. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005.

Chukanova VP., VI. Litvinov, LE. Pospelov, LV. Slogotskaia, 1995. Significance of hereditary predisposition factors in the development and course of pulmonary tuberculosis. Vestn-Ross-Akad-Med-Nauk 7:6-9.

Davies PDO., 1985. A possible link between vitamin D deficiency and impaired host defence to *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle 66:301-306.

Davis BD., R. Dulbecco, HN. Eisen, HS. Ginsberg, WB. Wood, 1972. Tratado de Microbiología. Salvat Editores, SA.

De Cock KM., RE. Chaisson, 1999. Will DOTS do it ? A reappraisal of tuberculosis control in countries with high rates of HIV infection. Int J Tuberc Lung Dis 3:457-465.

Dieve A., ML. Diaw, M. Ndiave, A. Thiam, A. Tall, A. Spiegel, R. Ndiave, 1999. HLA-DQ allele typing in a Senegalese population: comparative study of serology and PCR-SSP. Dakar Med 44:58-62.

Doherty DG., PT. Donaldson, 1991. HLA-DRB and DQB typing by a combination of serology, restriction fragment length polymorphism analysis and oligonucleotide probing. Eur J Immunogenet 18:111-24.

Dovgaliuk IF., VV. Vatutina, SI. Kuz'mina, OL. Korolenok, 1995. Clinical and immunogenetic aspects of children with local and multiple forms of primary tuberculosis. Probl Tuberk 5:24-7.

Dubaniewicz A., 2000. HLA-DR antigens in patients with pulmonary tuberculosis in northern Poland. Preliminary report. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 48:47-50.

Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema único de Información, 2003; 20. Cuadros 5 y 10.

Fedoseeva SV., MM. Iusopova, VP. Chukanova, LE. Pospelov, 1993. Course of infiltrating pulmonary tuberculosis depending on the patient's genotype. Probl Tuberk 2:8-10.

Flandre P., A. Morabia. Epi's ODDS. Epidemiologic tests on odds ratios. Copyright 11/3/1989.

Garza-Chapa R., 1983. Genetic distances for ABO and Rho(D) blood groups in the state of Nuevo León, México. Soc Biol 30:24-31.

Garza-Chapa R., H. Brandi-Escamilla, RA. Limón-Villalás, CH. Leal-Garza, 1982a. Population genetics in state of Nuevo León. III. Incidence of ABO, Rho(D), MN and other genetic traits among patients with cancer. Arch Invest Med (Méx.) 13:261-270.

Garza-Chapa R., MA. Rojas-Alvarado, RM. Cerda-Flores, 2000. Prevalence of NIDDM in Mexicans with paraphyletic and polyphyletic surnames. Am J Hum Biol 12:721-728.

Garza-Chapa R., LA. González-Souza, H. Garza-Treviño, M. Cavazos-Galván, CH. Leal-Garza, RM. Cerda-Flores, 1987. Population genetics in the state of Nuevo León, México. VII. Frequencies of ABO, Rho(D), MN, Kell and other genetic traits in patients with allergy. Arch Invest Med (Méx.) 18:13-24.

Garza-Chapa R., MI. Dávila-Rodríguez, CH. Leal-Garza, G. González-Quiroga, MA. Rojas-Alvarado, 1995. Gene frequencies and admixture estimates for ABO, Rho(D), and MN blood groups in persons with Mono- and Polyphyletic surnames in Monterrey, N. L., Mexico. Am J Hum Biol 7:65-75.

Goldfeld AE., JC. Delgado, S. Thim, MV. Bozon, AM. Uglialoro, D. Turbay, C. Cohen, EJ. Yunis, 1998. Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. JAMA 279:226-8.

Gorodezky C., 1994. Immunogenetics of leprosy. A model to understand host immune mechanisms in mycobacterial diseases. As Pac J Mol Biol Biotechnol 2:301-315.

Gorodezky C., 1997. Manual de prácticas de histocompatibilidad. XVI curso teórico-práctico de actualización en histocompatibilidad. INDRE-One Lambda, México, D.F.

Grange JM., A. Zumla, 2000. Advances in the management of tuberculosis: clinical trials and beyond. Curr Opin Pulm Med 6:193-7.

Gruenheid S., P. Gros, 2000. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. Curr Opin in Microbiol, 3:43-48.

Hafez M., O. Farag, F. Abdel-Wahab, Z. El-Morsy, H. El-Khayat, 1983. The inheritance of susceptibility to tuberculosis among Egyptian population. J Egypt Med Assoc 185.

Hafez M., A. el-Fiky, MR. Bassiouny, SA. el-Hafez, A. el-Morsy, A. Khaled, M. el-Ziny, Y. al-Tonbary, A. Settein, 1992. Clinico-immunogenetic study on Egyptian multicase tuberculous families. Dis Markers 10:143-9.

Hopewell PC., 1994.Overview of clinical tuberculosis. En: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Editado por Barry R. Bloom. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005.

Howard LW., MD. Klopfenstein, WJ. Steininger, C.E. Woodruff, 1970. The loss of tuberculin sensitivity in certain patients with active pulmonary tuberculosis. Chest 57:530-534.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 1995. Conteo de población y vivienda 1995.

Janeway CA. Jr., 1996. Immunobiology: The immune system in health and disease. Garland Publishing and Current Biology, Ltd.

Janeway CA., P. Travers, S. Hunt, M. Walport, 1997. The induction, Measurement and Manipulation of the immune response. En Immunobiology: The immune system in health and disease. 3ª edición, Current Biology Limited, London, San Francisco y New York.

John Hopkins Center for Tuberculosis Research. Epidemiology and natural history. Global. Americas TB cases. Data on the tuberculosis epidemia. Americas TB cases, 1996. Disponible en http://www.hopkins-tb.org/epi_global/global_4.shtml.

Kent DC., R. Schwartz, 1967. Active pulmonary tuberculosis with negative tuberculin skin reactions. Am Rev Respir Dis 95:411-418.

Khomenko AG., VI. Litvinov, VP. Chukanova, LE. Pospelov, 1990. Tuberculosis in patients with various HLA phenotypes. Tubercle 71:187-92.

Kishi F., T. Yoshida, S. Aiso, 1996. Location of NRAMP1 molecule on the plasma membrane and its association with microtubules. Mol Immunol 33:1241-6.

Knoring BE., AS. Berkoz, IIa. Sakharova, 1995. Distribution of histocompatibility antigens in patients with pulmonary tuberculosis depending on disease course and immune response pattern. Probl Tuberk 2:16-9.

Kumate J., G. Gutiérrez, 1980. Manual de Infectología. Eds. Médicas del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". 7a. Ed.

LeBlanc SB., EG. Naik, L. Jacobson, RA. Kaslow, 2000. Association of DRB1*1501 with disseminated Mycobacterium avium complex infection in North American AIDS patients. Tissue Antigens 55:17-23.

Lechler R., 1994. Mechanisms of HLA and disease associations. HLA and disease. Academic Press LTD, 83-39.

Liu ZH., YL. Luo, L. Zhou, WH. Xu, DY. Feng, YJ. Tan, X. He, CX. Song, Y. Fu, ZQ. Liu, 2004. A study on the correlation between HLA-DR genes and susceptibility to pulmonary tuberculosis in a population of Han nationality from southern China. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 27:390-3.

Lucas S., AM. Nelson, 1994. Pathogenesis of Tuberculosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected People. En: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Editado por Barry R. Bloom. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005.

Lurie MB., 1964. Resistance to tuberculosis experimental studies in native and acquired defensive mechanisms. Cambridge: Harvard University Press, 115-180.

Malo D., K. Vogan, S. Vidal, J. Hu, M. Cellier, E. Schurr, A. Fuks, N. Bumstead, K. Morgan, 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. Genomics 23:51-61.

Mandell GL., RG. Douglas, JE. Bennett, 1991. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. Ed. Médica Panamericana. 3a. Ed. Argentina.

Master RN., 1994. Mycobacteriology. En: Isenberg H.D. (Ed. In Chief) Clinical Microbiology. Procedures Handbook. American Society for Microbiology. Washington D.C. Vol. 1. Pp. 3.0.1- 3.16.3,.

McLeod R., E. Buschman, LD. Arbuckle, E. Skamene, 1995. Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens. Curr Opin Immunol 7:539-52.

McPeek M., J. Salkowitz, H. Laufman, D. Pearl, BS. Zwilling, 1992. The expression of HLA-DR by monocytes from black and from white donors: different requirements for protein synthesis. Clin Exp Immunol 87:163-8.

Mehra NK., V. Taneja, TK. Chaudhri, et al., 1986. Pulmonary tuberculosis: joint report. En: Proceedings of the 3rd Asia-Oceania Histocompatibility Workshop Conference (Sapporo, Japan). Sapporo: Hokkaido University Press 374-9.

Mehra NK., W. Verduijn, V. Taneja, J. Drabbels, SP. Singh, MJ. Giphart, 1991. Analysis of HLA-DR2-associated polymorphisms by oligonucleotide hybridization in an Asian Indian population. Hum Immunol 32:246-53

Mehra NK., R. Rajalingam, DK. Mitra, V. Taneja, MJ. Giphart, 1995. Variants of HLA-DR2/DR51 group haplotypes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis in Asian Indians. Int J Lepr Other Mycobact Dis 63(2):241-8.

Meyer CG., J. May, K. Stark, 1998. Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. Trends in Microbiology 6:148-154.

Middleton D., F. Williams, 1997. A history of DNA typing for HLA. Terasaki and Gjertson, Eds. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California.

Mullis KB., F. Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155:335-350.

Novartis 217: Genetics and Tuberculosis, 1998. John Wiley & Sons Ltd. Print ISBN 0-471-98261-X, e-ISBN 0-470-84652-6.

Olerup O., H. Zetterquist, 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 39:225-35.

Pozsik CJ., 1993. Compliance with tuberculosis therapy. Med Clin North Am 77:1289-301.

Rajalingam R., NK. Mehra, RC. Jain, VP. Myneedu, JN. Pande, 1996. Polymerase chain reaction-based sequence-specific oligonucleotide hybridization analysis of HLA class II antigens in pulmonary tuberculosis: relevance to chemotherapy and disease severity. J Infect Dis 173:669-76.

Rani R., SA. Zaheer, R. Mukherjee, 1992. Do human leukocyte antigens have a role to play in differential manifestation of multibacillary leprosy: A study on multibacillary leprosy patients from North India. Tissue Antigens 40:124-127.

Raviglione MC. JP. Narain, A. Kochi, 1992. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis and treatment. Bull World Health Organ 515-26.

Ravikumar M., V. Dheenadhayalan, K. Rajaram, SS. Lakshmi, PP. Kumaran, CN. Paramasivan, K. Balakrishnan, RM. Pitchappan, 1999. Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. Tuber Lung Dis 79:309-17.

Reynolds WM., PR. Evans, AC. Lane, WM. Howell, PJ. Wilson, R. Wong, JL. Smith, 1994. Automated HLA-B27 testing using the FACSPrep/FACScan system. Cytometry (Com. Clin. Cytometry) 18:109.

Rodríguez-Suárez RS., 1994. Reumatología Pediátrica. Ed Interamericana McGraw-Hill. México.

Roitt I., Brostoff J., Male D., 1998. Immunology. Ed. Mosby. 4a Ed. Barcelona, España.

Rossman MD., RR. Mac Gregor, 1994 Tuberculosis. Clinical management and new challenges. Mc Graw Hill 294-295.

Said-Fernández S., JA. Enciso-Moreno, J. Torres-López, J. Castro-Garza, L. Navarro-Marmolejo, P. Becerril-Montes, M de los A. Rojas-Alvarado, G. Caballero-Olín, H. Valdéz-Salazar, LL. Flores-Ibarra, N. Pernas Buitrón, S. Valdovinos-Chávez, HG. Martínez-Rodríguez, J. Luna-Herrera, 2001. Cap. II. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis Pulmonar en el Norte de México. En: García-Peña C., H. Reyes-Morales, L. Viniegra Velásquez (Eds.). Las múltiples facetas de la Investigación en Salud: Proyectos estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social. Editorial Sestante, S.A. de C.V. México D.F., pp. 201-220.

Saiki R., S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, HA. Erlich, N. Arnheim, 1985. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.

Saiki RK., DH. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, KB. Mullis, HA. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 329:487-491.

Schneider S., K. Jean-Marc, D. Roessli, L. Excoffier, 1997. Arlequin ver. 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland..

Siddigi SH., 1996. Bactec 460 TB System. Product and Procedure Manual. Beckton Dickinson Company. Maryland, USA.

Singh SP., NK. Mehra, HB. Dingley, JN. Pande, MC. Vaidya, 1983. HLA-A, -B, -C, and -DR antigen profile in pulmonary tuberculosis in North India. Tissue Antigens 21:380-4.

Singh SP., NK. Mehra, HB. Dingley, JN. Pande, MC. Vaidya, 1983. Human leukocyte antigen (HLA)- linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLA-DR types. J Infect Dis 148:676-81.

Smith PG., AR. Moss, 1994. Epidemiology of Tuberculosis. En: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Editado por Barry R. Bloom. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005.

Snider DE., M. Raviglione, K. Arata, 1994. Global burden of tuberculosis. En: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Editado por Barry R. Bloom. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005.

Sriram U., P. Selvaraj, SM. Kurian, AM. Reetha, PR. Narayanan, 2001. HLA-DR2 subtypes & immune responses in pulmonary tuberculosis. Indian J Med Res 113:117-24.

Strong BE., GP. Kubica, 1981. Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory. Washington DC, US Department of Health and Human Services, HHS publication no (CDC) 81-8390.

Styblo K., D. Dankova, J. Drapela, 1967. Epidemiological and clinical study of tuberculosis in the district of Kolin. Czechoslovakia. Bull. W.H.O. 37:819-874.

Terán-Escandón D., L. Terán-Ortiz, A. Camarena-Olvera, G. González-Avila, MA. Vaca-Marín, J. Granados, M. Selman, 1999. Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. Chest 115:428-33

Terasaki PI., JD. McClelland, 1964. Microdroplet assay of human serum cytotoxin. Nature 204:998-9.

Vartdal F., G. Gaudernack, S. Funderud, A. Bratlie, T. Lea, J. Ugelstad, E. Thorsby, 1986. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation – a fast and reliable technique. Tissue Antigens 28:301-312.

Velasco-Rodríguez VM., VA. Martínez-Ordaz, J. Roiz-Hernández, F. Huazano-García, A. Nieves-Rentería, 2003. Muestreo y Tamaño de Muestra. Una guía práctica para personal de salud que realiza investigación. Ed. e-libro.net. 1a. Ed. virtual y en papel. Buenos Aires, Argentina.

Verduyn W., II. Doxiadis, J. Anholts, JJ. Drabbels, A. Naipal, J. D'Amaro, GG. Persijn, MJ. Giphart, GM. Schreuder, 1993. Biotinylated DRB sequence-specific oligonucleotides. Comparison to serologic HLA-DR typing of organ donors in eurotransplant. Hum Immunol 37:59-67.

Vidal S., P. Gros, Skamene E., 1995. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. J Leukoc Biol 58:4 382-90.

Voet D., JD. Voet, 1995. Biochemistry. 2nd Ed. Wiley & Sons.

von Pirquet C., 1908. Verlauf der tuberkulösen allergie bei einer falle von masern un miliar-tuberkulose. Wien Klin Wochenschr 21:861-865.

Wake CT., EO. Long, B. Mach, 1982. Allelic Polymorphism and complexity of the genes for HLA-DR beta-chains direct analysis by DNA-DNA hybridization. Nature 300:372-374.

WHO, 2002. Stop TB, Annual Report 2001, pp. 1-17.

WHOb Report 2003. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. WHO/CDS/TB/2003.316. pp 1-290. Disponible en: http://www.who.int/gtb/publications/globrep02/contents.html

World Health Organization - GTB, 1996. WHO global tuberculosis programe. World TB day. WHO report on the TB epidemic.

Yoshida T., K. Takegawa, F. Kishi, 1999. Functional analysis of the human NRAMP family expressed in fission yeast. Tabuchi M, Biochem J 344 1: 211-9.

Ziegler A., LL. Field, AY. Sakaguchi, 1991. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. Cytogenet Cell Genet 58:295-336.