

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



**Polimorfismos en el gen que codifica al receptor de manosa de macrófagos
con actividad de lectina (CD206) en pacientes con tuberculosis pulmonar**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

PRESENTA LA

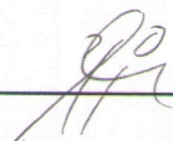
Q.B.P. MARIA RITA MORENO JUAREZ

MONTERREY, N.L.

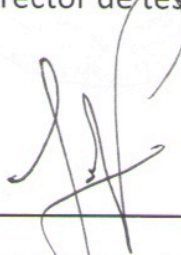
DICIEMBRE 2014

Polimorfismos en el gen que codifica al receptor de manosa de macrófagos con actividad de lectina (CD206) en pacientes con tuberculosis pulmonar

Aprobación de la tesis:



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Director de tesis



Dr. med. Luis Adrián Rendón Pérez
Co-Director



Dra. C. Gloria María González González
Miembro de la comisión



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micobacterias del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) perteneciente al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres por su gran apoyo incondicional y paciencia durante la realización de este trabajo.

A mis hermanas que al igual que mis padres siempre estuvieron apoyándome.

A mi comisión de Tesis Dr. C. José Prisco Palma- Nicolás, Dr. med. Luis Adrián Rendón Pérez y la Dr. C. Gloria María González González por el gran apoyo y valiosos consejos a lo largo de la realización de este trabajo.

A la Química María Romelia Ballesteros Elizondo por depositar su confianza en mí, su gran apoyo y su invaluable amistad.

A las personas del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León que me dieron la oportunidad de estudiar esta Maestría y siempre estuvieron apoyándome.

A mis compañeros y amigos del departamento de Microbiología y de mi generación de Maestría.

CONTENIDO

Sección	Pág.
1.INTRODUCCION	1
1.1 Relevancia de la tuberculosis	1-2
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2-4
1.3 Respuesta inmune a la infección por <i>M. tuberculosis</i>	4-6
1.4 Mecanismos de evasión de <i>M. tuberculosis</i>	6-8
1.5 Factores de patogenicidad/virulencia	8-12
1.6 El receptor de Manosa de macrófagos (MRC-1,CD206)	12-13
1.6.1 Estructura del receptor de manosa	13-15
1.6.2 Expresión del receptor de la manosa	15-16
1.6.3 Papel biológico del receptor de la manosa	16-18
2.ANTECEDENTES	19-24
3. JUSTIFICACION	25
4. HIPOTESIS	26
5.OBJETIVO	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
6.MATERIALES Y METODOS	28-34
7.RESULTADOS	35-48
8.DISCUSION	49-52
9.CONCLUSIONES	53
10.BIBLIOGRAFIA	54-67
ANEXOS	68-76

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
Fig. 1	Representación esquemática del LAM.	10
Fig. 2	Patrones de digestión esperados después de la digestión del exón 7 del gen <i>mrc1</i> con EcoR1.	36
Fig. 3	Patrones electroforéticos esperados con iniciadores alelo específicos para los SNPs G396S y T399A.	36
Fig. 4	Comparativa de la edad entre casos (TBP) y controles.	38

LISTA DE TABLAS

Número	Título	Página
Tabla 1	Receptores celulares/ligandos de <i>Mycobacterium</i> .	5
Tabla 2	Iniciadores alelo específicos.	33
Tabla 3	Características de controles sanos y pacientes con Tb pulmonar.	39
Tabla 4	Frecuencias alélicas para L407F en Hombres y Mujeres.	40
Tabla 5	Frecuencias alélicas para L407F en el grupo control y el grupo casos TBP.	41
Tabla 6	Distribución de genotipos del SNP L407F y asociación con Tb pulmonar.	41
Tabla 7	Frecuencias alélicas para G396S en Hombres y Mujeres.	43
Tabla 8	Frecuencias alélicas para G396S en el grupo control y el grupo casos TBP.	43
Tabla 9	Distribución de genotipos del SNP G396S y asociación con Tb pulmonar.	44
Tabla 10	Frecuencias alélicas para T399A en Hombres y Mujeres.	45
Tabla 11	Frecuencias alélicas para T399A en el grupo control y el grupo casos TBP.	46
Tabla 12	Distribución de genotipos del SNP T399A y asociación con Tb pulmonar.	47
Tabla 13	Estimación de la frecuencia de haplotipos.	48

LISTA DE ANEXOS

LETRA	Título	Página
A	Preparación de reactivos y soluciones empleadas	68-69
B	Formato de encuesta realizada a pacientes participantes del estudio	70-71
C	Formato de consentimiento informado	72-76

NOMENCLATURA

BAAR	Bacilo ácido-alcohol resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CD	Cluster of differentiation
°C	Grados centígrados
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DLTC	Dominios de Lectina tipo C
DNA	Deoxyribonucleic acid
FNII	Dominio de Fibronectina dos
LAM	Lipoarabinomanano
μM	Micromolar
μm	Micrometros
μl	Microlitros
M. tb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	Multidrogoresistente/Multifarmacoresistente
MHC	Major Histocompatibility Complex, Complejo Principal de Histocompatibilidad
ml	Mililitro
MPM	Marcador de Peso Molecular
NLR	(NOD-Like Receptor) Receptores tipo NOD
ng	Nanogramos
OR	Odds Ratio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
RC	Dominio rico en cisteína
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
MRC1	Receptor de manosa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RRP	Receptores reconocimiento de patrón
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAES	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
TB/TBP	Tuberculosis / Tuberculosis pulmonar
TLR	(Toll-Like Receptors) Receptores tipo Toll
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Q.B.P. María Rita Moreno Juárez.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Número de páginas:76

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica:

Área de estudio: Micobacteriología

Título del estudio:

“Polimorfismos en el gen que codifica al receptor de manosa de macrófagos con actividad de lectina (CD206) en pacientes con tuberculosis pulmonar.”

Propósito y método de estudio

El receptor de manosa de macrófagos (CD206, MRC1) es un miembro de la familia de las lectinas de tipo C involucrado en el reconocimiento de patógenos, y juega un papel importante en la respuesta inmune del hospedero a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *mrc1* podrían afectar los niveles de expresión de este receptor, y diferencias en su estructura primaria podrán tener efectos sobre su función en el reconocimiento de proteínas/antígenos, influenciando de esta manera la susceptibilidad de los individuos al desarrollo de la tuberculosis pulmonar. A nivel mundial hay pocos estudios que asocian la existencia de SNPs en el gen *mrc1* con el desarrollo de tuberculosis pulmonar, y los datos reportados sugieren que estos difieren considerablemente de una población a otra. En población mexicana no hay estudios publicados acerca de la posible asociación de SNPs en el receptor de manosa y el desarrollo de tuberculosis pulmonar. Dado que la tuberculosis es una enfermedad infecciosa que causa aproximadamente 1.3 millones de muertes al año a nivel mundial (según datos de la Organización Mundial de la Salud), es importante identificar genes candidato que contribuyan a clarificar la patogénesis de esta enfermedad. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad en el gen que codifica al receptor de manosa (*mrc1*) y su posible asociación genética con el desarrollo de tuberculosis pulmonar. En un estudio de casos (N=65) y controles(N=96) se analizaron mediante genotipificación 3 SNPs no sinónimos del exón 7 del gen *mrc1* para determinar su asociación con tuberculosis pulmonar.

Conclusiones y contribuciones: Los 3 SNPs analizados en este estudio (Rs1926736, Rs2478577 y Rs2437257, ubicados en el exón 7 del gen *mrc1*), resultaron polimórficos en la población. La variante 1221c>g no se encontró asociada al desarrollo de tuberculosis pulmonar en la población, sin embargo se encontró una asociación estadísticamente significativa para los polimorfismos 1188a>g y 1197g>a, encontrándose un efecto protector para los alelos 1188g y 1197a. El haplotipo a-g-c/S-A-F se encontró más frecuente en el grupo de pacientes con Tb pulmonar, lo que puede indicar que está asociado a tuberculosis pulmonar como un factor de riesgo; mientras que el haplotipo g-g-c/G-A-F se encontró mayoritariamente representado en el grupo control lo que puede sugerir que este haplotipo estaría asociado como un factor protector.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Relevancia de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*). La infección por *Mycobacterium tuberculosis* afecta inicialmente a los pulmones (TBP); sin embargo, en un bajo número de casos la diseminación hematológica del microorganismo a partir del foco primario de infección da lugar a TB extra pulmonar (1). Las localizaciones extrapulmonares más frecuentes son los ganglios linfáticos (linfadenitis tuberculosa), pleura (tuberculosis pleural), sistema genitourinario (tuberculosis renal), sistema osteoarticular (tuberculosis ósea), y meninges (tuberculosis meníngea).

Entre los factores asociados al desarrollo de esta enfermedad destacan el estado del sistema inmunológico (inmunodeficiencias primarias, adquiridas, mala nutrición, etc.), la edad, y factores socio-económicos que inciden directamente en el acceso a los servicios de salud.

Se ha estimado que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*; sin embargo, sólo aproximadamente el 10% de los individuos infectados desarrollarán la enfermedad en su forma activa en algún momento de su vida.

A pesar de los esfuerzos internacionales para tratar de limitar el avance de la pandemia a través de la búsqueda de los individuos infectados, el establecimiento del diagnóstico temprano y la implementación del tratamiento acortado estrictamente supervisado

(TAES), la TB causó 1.3 millones de muertes en el año 2012, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de un total de 8.6 millones de personas que desarrollaron la TBP(77).

El creciente aumento de casos de inmunodeficiencia adquirida causada por la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistente o multidrogoresistente (MDR) a los fármacos antituberculosos, hacen cada vez más difícil el control de la enfermedad. La OMS estimó que en el año 2012 había, 1.1 millones de nuevos casos de TB-VIH positivos y 310,000 casos de TB-MDR en (77).

En México, según cifras de la Secretaría de Salud 19,703 personas enfermaron de TB en el año 2013, y los estados con mayor número de casos de TBP fueron: Baja California Norte, Nuevo León, Tamaulipas, Guerrero, Veracruz y Chiapas. El estado de Nuevo León en particular concentra un número importante de casos de tuberculosis. Tan solo en el año 2013 se presentaron 1,060 casos de TBP en donde el grupo de edad más afectado fue el de 25 a 44 años. Hasta el mes de septiembre del año en curso se han reportado 838 nuevos casos en Nuevo León. (63).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

En términos taxonómicos *Mycobacterium tuberculosis* pertenece al Dominio Bacteria, Filo *Actinobacteria*, Orden Actinomycetales, Suborden *Corynebacterineae*, Familia *Mycobacteriaceae* y Género *Mycobacterium*. El Complejo *Mycobacterium tuberculosis* incluye a las especies *M. tuberculosis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*,

M. canetti, *M. microtti* y *M. pinnipedii*. Las especies que pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* son bacilos ligeramente curvos o rectos, intracelulares obligados, aerobios, inmóviles, que miden de 1-4 x 0.3-0.6 μm aproximadamente.

No es posible clasificar las micobacterias en gram positivas o gram negativas ya que no se tiñen adecuadamente con la tinción de Gram, pero pueden teñirse por el método de Ziehl-Neelsen, en el que resisten a la decoloración final por ácido/ alcohol, por lo que se denominan “bacilos ácido alcohol resistentes” (B.A.A.R.). Esta propiedad de ácido alcohol resistencia se debe en parte a la complejidad estructural de la pared celular, la cual es muy rica en lípidos, lo que también la hace resistente a la mayoría de los desinfectantes, a la desecación y a los detergentes catiónicos, aunque es sensible al calor y a la radiación ultravioleta.

Mycobacterium tuberculosis obtiene energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono como glucosa y glicerol. Crece en medios simples suplementados con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio. Forma colonias rugosas no pigmentadas después de 14 a 28 días de incubación a 37 °C en medios de Löwenstein-Jensen o Middlebrook. Su crecimiento es más favorable en una atmósfera de con 5 a 10% de dióxido de carbono (CO_2), aunque sigue siendo muy lento, con un tiempo medio de generación de 16 a 24 horas.

El genoma de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, que es utilizada como referencia en múltiples estudios actuales fue publicado en 1998, y consiste en 4.4×10^6

pares de bases, conteniendo aproximadamente 4,000 genes de los cuales solo se ha descrito la función del 40% de ellos (15).

1.3 Respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*

El espacio alveolar está provisto con mecanismos innatos de defensa que involucran a los macrófagos alveolares, las células dendríticas, los neutrófilos, los linfocitos B, las células epiteliales, las células alveolares tipo I y tipo II, así como factores solubles como la mucina, lisozima, lactoferrina, proteínas surfactantes, defensinas, catelicidinas, inmunoglobulinas y proteínas del sistema del complemento. Todos estos componentes participan en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar y en la eliminación de partículas infecciosas que entran por el tracto respiratorio.

La tuberculosis pulmonar se adquiere por la inhalación de micropartículas infecciosas (<5µm) producidas al toser o estornudar, por parte de un individuo con tuberculosis pulmonar activa. Una vez que *M. tuberculosis* atraviesa la barrera mucociliar del tracto respiratorio se enfrenta a los macrófagos alveolares, los cuales constituyen la primera línea de defensa y este primer contacto es relevante para lograr el control de la infección o para que se desarrolle la enfermedad activa. La fagocitosis de *M. tuberculosis* es principalmente llevada a cabo por los macrófagos alveolares a través de diversos mecanismos utilizando diversos receptores como son: CD14, receptores para la fracción constante de las inmunoglobulinas (Fc) cuando la micobacteria ha sido opsonizada por anticuerpos (Acs), receptores de complemento (CR1, CR3 y CR4), ya que al activarse la vía alterna del complemento C3b y C3bi son depositados en la superficie de la micobacteria y

éstos son reconocidos por CR1 y CR3/CR4 presentes en la superficie en los macrófagos alveolares, el receptor de manosa (CD206) que interaccionan con el lipoarabinomano (LAM) de la micobacteria , receptores scavengers (CD36) y receptores para la proteína surfactante A (SP-A). Tabla 1 (4, 22).

Tabla 1. Receptores celulares/ligandos de *Mycobacterium*.

Glicolípidos	Receptores celulares
ManLAM	Receptor de manosa (CD206)
ManLAM	DC-SIGN (CD209)
AraLAM	CD14-TLR2
Sulfolípidos	SR-A (Scavenger)
Dimicolato de trealosa (Factor cuerda)	Mincle

La interacción entre *M. tuberculosis* y el sistema inmune innato inicia la respuesta inflamatoria local, que se caracteriza por un reclutamiento de células mieloides a pulmón, en particular de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), y monocitos. Posteriormente, las bacterias viables se diseminan hacia los ganglios linfáticos regionales, donde los linfocitos T son activados vía MHC y se generan linfocitos T efectores que también serán reclutados al pulmón. En la respuesta inmune adaptativa las principales poblaciones celulares que intervienen son los linfocitos T CD4+, cuya función principal es secretar citocinas tipo Th1 como son el interferón gama (IFN- γ) y la interleucina 2 (IL-2), así como linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica contra las células infectadas (7).

En la mayoría de los casos el proceso infeccioso es controlado por el sistema inmune, sin embargo *Mycobacterium tuberculosis* tiene la capacidad de persistir de manera indefinida dentro de los macrófagos gracias a una diversidad de mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero, generando una infección crónica latente a nivel pulmonar (TB latente). Los individuos con TB latente no presentan la forma clínica de la tuberculosis, por lo que en este estadio no transmiten el patógeno a la población, ya que las micobacterias permanecen confinadas por el sistema inmune dentro de estructuras especializadas denominadas granulomas (27).

Cuando ocurre una disminución de la respuesta inmune celular (tratamiento inmunosupresor, VIH/SIDA, desnutrición severa, entre otros), los granulomas pierden su complejidad estructural, se desorganizan, y finalmente ocurre la reactivación de las lesiones pulmonares, con la aparición de los signos y síntomas asociados a la tuberculosis pulmonar activa, y el individuo constituye una fuente de contagio para la población.

1.4 Mecanismos de evasión de *M. tuberculosis*

Una vez que los macrófagos alveolares fagocitan a *M. tuberculosis* se inicia una serie de mecanismos bactericidas por parte del sistema inmune innato. Uno de los más importantes se conoce como “estallido respiratorio”, cuyo objetivo es la eliminación de las bacterias fagocitadas. El mecanismo requiere el adecuado ensamblaje y activación de la enzima NADPH oxidasa para producir anión superóxido (O_2^-) y de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) para producir óxido nítrico (NO). Se ha demostrado que *M.*

tuberculosis inhibe de diferentes maneras a los intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) y a los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI), impidiendo de esta manera el estado respiratorio. En particular, la proteína NoxR codificada por el gen *noxR1* se ha encontrado en cepas virulentas de *M. tuberculosis* y se ha demostrado que confiere resistencia contra los radicales libres (21).

Se ha descrito que el sistema de secreción SecA2 es importante para la liberación de las enzimas superóxidodismutasa (SodA) y catalasa peroxidasa (KatG). La función de ambas enzimas es mantener el fagosoma sin producción de radicales libres. Debido a que SodA actúa sobre O_2^- para convertirlo en H_2O_2 y O_2 , H_2O_2 inmediatamente es transformado en H_2O y O_2 por la enzima KatG. De esta manera, el ambiente intracelular está exento de radicales libres, lo cual es benéfico para la sobrevivencia de la micobacteria (47).

Una vez que la bacteria se encuentra en el fagosoma de las células fagocíticas, se inicia un proceso de maduración fagosomal cuya finalidad es la fusión del fagosoma con los lisosomas, los cuales contienen una gran cantidad de enzimas líticas que son funcionales a pH entre 4.5 a 5.0, lo que favorece un ambiente ácido idóneo para la destrucción de los patógenos; sin embargo se ha demostrado que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de detener el proceso de maduración fagosomal permaneciendo en un estadio de fagosoma temprano (75).

Inicialmente se observó que la falta de acidificación en los fagosomas que contenían a la micobacteria se debía a una exclusión de la ATPasa vacuolar, lo que daba lugar a una degradación y presentación deficiente de los antígenos (49). Otra estrategia propuesta

como responsable de evitar la fusión fagosoma-lisosoma es la retención de proteínas Rab, las cuales son GTPasas de bajo peso molecular que están relacionadas en el proceso de fusión de membranas y el transporte vesículas. Estas proteínas se han identificado como marcadores importantes de la maduración fagosomal, por ejemplo: Rab5 se encuentra en fagosomas tempranos, mientras que Rab7 en fagosomas tardíos. Se ha visto que la micobacteria secreta un factor que inactiva la interacción de Rab7 con RILP (Rab7-interacting lysosomal protein), unión necesaria para que ocurra la fusión con los lisosomas (68). También existe evidencia experimental que sugiere que Rab14 es reclutada y mantenida por largos periodos en los fagosomas que contienen *M. tuberculosis*; al parecer la bacteria inhabilita a Rab14 para que promueva la interacción fagosoma-lisosoma (33).

También, se ha observado que macrófagos infectados in vitro con *M. tuberculosis* inhiben la expresión de las moléculas presentadoras de antígeno de clase II (MHC-II), probablemente por un defecto en el transporte endocítico (30). La disminución en la expresión de MHC-II disminuye la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4+, en consecuencia hay menor activación celular, producción de citocinas y reducción de los mecanismos micobactericidas, favoreciendo la sobrevivencia de *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos infectados.

1.5 Factores de patogenicidad/virulencia

La pared celular de *M. tuberculosis* es una de las más complejas entre los microorganismos conocidos. Es dos veces más gruesa y resistente que la de las bacterias Gram negativas y constituye una verdadera coraza lipídica, difícilmente penetrable, que

otorga a la micobacteria su típica resistencia a la acción del alcohol y los ácidos (75). Los lípidos que contiene en su pared celular constituyen el 30-60% del peso seco de la bacteria. Los principales componentes de dicha pared son peptidoglicanos, arabinogalactanos y ácidos micólicos, unidos entre sí por medio de enlaces covalentes. Además, posee un alto contenido de glicolípidos, en particular α - α -dimicolato de trehalosa (DMT) y α - α -monomicolato de trehalosa (MMT).

Otro glicolípido muy importante de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* es el lipoarabinomano (LAM), el cual está compuesto de 3 dominios: dominio de cubierta o “capucha”, una estructura carbonatada y un dominio de fosfatidilinositolmanósido con el cual este glicolípido está anclado a la membrana plasmática. Se han identificado 3 diferentes tipos de LAM por su dominio de cubierta: el LAM recubierto con manosa (manLAM), el LAM recubierto con fosfo-mio-inositol (PILAM) y el LAM no recubierto (AraLAM), como se esquematiza en la Figura 1. Estas variantes estructurales no están presentes en todas las especies de micobacterias y se sabe que tienen importantes propiedades inmunosupresoras. En el caso de las micobacterias patógenas de lento crecimiento como *M. tuberculosis* y *M. leprae*, así como en *M. bovis*-BCG, el LAM está recubierto externamente por unidades de manosa (manLAM) lo que favorece su interacción con el receptor de manosa de macrófagos (CD206), a diferencia de LAM recubierto con arabinosa, el cual es característico de las micobacterias no patógenas como *M. chelonae*. Otra micobacteria de crecimiento rápido y poco virulenta como el caso de *M. smegmatis* y *M. fortuitum* presentan un “cap” de residuos de mio-inositol fosfato (PILAM) (75).

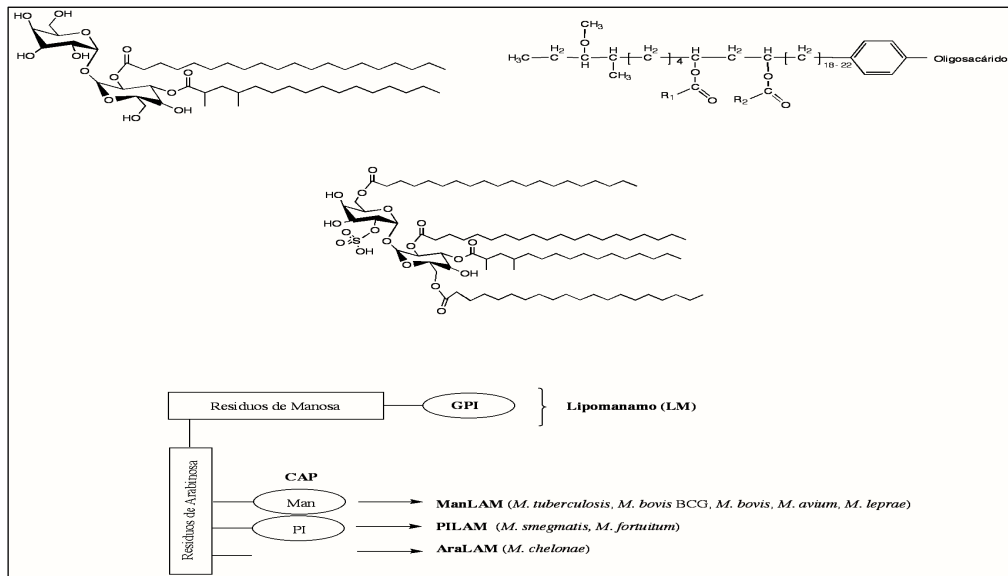


Figura 1. Representación esquemática del LAM. El LAM es un glicolípido presente en la pared celular de diferentes especies de *Mycobacterium*, el cual está compuesto de 3 dominios: dominio de cubierta o “capucha”, una estructura carbonatada y un dominio de fosfatidilinositolmanósido con el cual este glicolípido está anclado a la membrana plasmática. Se han identificado 3 diferentes tipos de LAM por su dominio de cubierta: el LAM recubierto con manosa (manLAM), el LAM recubierto con fosfo-mio-inositol (PILAM) y el LAM no recubierto (AraLAM).

Dado que las especies patogénicas de micobacterias son parásitos facultativos intracelulares que infectan y residen en células hospedadoras, algunas de estas moléculas pueden representar factores de virulencia potenciales, como se ha demostrado por la capacidad que tienen algunos de estas moléculas para inhibir la actividad microbicida de los macrófagos, y la proliferación de las células T (60). Estas actividades biológicas pueden derivar al menos en parte de la modulación de funciones celulares a través de las interacciones entre membranas del hospedero y lípidos de membrana expuestos cuya estructura es diferente a los componentes de membranas de células de mamíferos (18).

En diversos estudios se ha demostrado que numerosos lípidos micobacterianos interfieren con la maduración y función biológica de las células dendríticas. Las células dendríticas son iniciadoras y reguladoras clave de la respuesta inmune celular ya que tienen la capacidad de activar a las células T naïve contra los antígenos microbianos, produciendo citocinas proinflamatorias y quimiocinas que atraen a las células efectoras de la respuesta inmune innata al sitio de la infección inicial (56).

Las moléculas de la micobacteria que poseen manooligosacáridos terminales parecen desempeñar un papel importante en la inhibición del TNF- α e IL-12 en células dendríticas y en macrófagos, pero incrementan la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de IL-10 (3). El GM-CSF y la IL-10 favorecen la prevalencia de la infección; la primera estimula la producción de granulocitos y células mononucleares precursoras de los macrófagos, los cuales llegan a convertirse en células hospederas de las micobacterias (11). La IL-10 inhibe la producción de otras citocinas como IL-12 y TNF- α ; también inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras de manera selectiva como la ruta coestimuladora CD28 al bloquear la fosforilación de esta molécula. También puede inhibir la expresión de otras moléculas coestimuladoras en las células dendríticas y macrófagos así como moléculas MHC clase II, por lo que los macrófagos se ven limitados en su función como células presentadoras de antígeno (48). Una de las principales funciones de la IL-12 es inducir la diferenciación de los linfocitos T CD4 a células efectoras Th1. Esta población Th1 está directamente asociada con el control de las infecciones intracelulares, por lo que la ausencia de esta subpoblación también favorece la prevalencia de la infección (1).

La AraLAM junto con el IFN- γ sinergiza para la producción de óxido nítrico en ausencia de TNF- α , en cambio ManLAM requiere de ambas citocinas (8). Esto es una ventaja para las cepas que contienen ManLAM porque sobreviven con mayor facilidad en el interior del macrófago que las cepas que expresan AraLAM.

La interacción de manosas terminales del ManLAM con receptores de manosa del macrófago inhiben la producción de IL-12 cuando dichos macrófagos han sido activados con algún estímulo previo, y en cambio inducen la producción de la citocina antiinflamatoria TGF- β , por lo que se ha propuesto que el ManLAM contribuye a la persistencia intracelular de *M. tuberculosis* (48), probablemente mediante la activación de la tirosina fosfatasa 1 (SHP-1), que promueve la desfosforilación de múltiples proteínas de señalamiento intracelular como a las Cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPK), las cuales están involucradas en la transducción de señal por el receptor de la IL-12 (IL-12R).

1.6 El receptor de manosa de macrófagos (MRC-1, CD206).

Los receptores reconocimientos de patrón (PRRs, Pattern recognition receptors) están localizados en la superficie de las células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, entre otras) y constituyen el elemento principal para el reconocimiento de patógenos por el sistema inmune innato. Se han descrito diversas familias de PRRs, entre los que se incluyen: los Receptores tipo Toll (TLRs, Toll-like receptors), Receptores tipo NOD (NLRs, Nod-like receptors) y los receptores de lectina de tipo C (CLRs, C-Type lectin receptors), a ésta última familia corresponde el receptor de manosa CD206 (65).

Los receptores de manosa son proteínas transmembrana tipo I que poseen dominios estructurales y funcionalmente relacionados como el reconocimiento de azúcares (manosa, fucosa, N-acetilglucosamina) en su porción extracelular. El receptor de manosa (CD206), el receptor de fosfolipasa A2 del tipo M (PLA2R), DEC-205 y Endo180 pertenecen a la superfamilia de las lectinas de tipo C (dependientes de Ca^{++}).

El Receptor de manosa de macrófagos (MRC1) también identificado como CD206, es una proteína transmembrana de 175 kDa codificada en el genoma humano en el cromosoma 10p13. Fue reconocido por primera vez a finales de 1970 como un receptor endocítico en macrófagos alveolares de conejo, e implicado en la liberación de glicoproteínas endógenas (42). Obtuvo su nombre debido a que reconoce estructuras de péptido glicano que contienen fucosa, manosa y N-acetilglucosamina, las cuales ahora se sabe que se encuentran en las paredes celulares de microorganismos tan diversos como hongos, micobacterias, parásitos, levaduras. Dichas moléculas son denominadas PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns), y son reconocidas por el sistema inmune innato por los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs).

1.6.1 Estructura del receptor de manosa

El MRC1 consiste en una cadena polipeptídica con 4 regiones bien definidas: una región extracelular que contiene un dominio rico en cisteína (RC), un dominio que contiene repeticiones de fibronectina de tipo dos (FN-II), ocho dominios de lectina (reconocimiento de carbohidratos) de tipo C (CTLDs, C-Type lectin domain), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática muy corta (20).

El dominio del MRC1 en el extremo N- terminal de 20-21 aminoácidos ricos en cisteína permite la oligomerización por formación de puentes disulfuro. El dominio extracelular RC puede reconocer azúcares sulfatados como SO₄-4-GalNAc (N-acetil galactosamina), SO₄-3-GalNAc y SO₄-3-Gal, por lo tanto permite el reconocimiento de las hormonas glicoproteicas producidas por la pituitaria anterior, como la lutropina, sulfatos de condroitín A y B y oligosacáridos sulfatados de grupo sanguíneo tipos Lewis^a y Lewis^x los cuales contienen SO₄-3-Gal y GlcNAc (N-acetil glucosamina) (36). El dominio RC se pliega en una forma de β -trébol triple simétrica (37). La unión del ligando a este dominio se lleva a cabo en un bolsillo neutral en el tercer lóbulo. El residuo de Triptófano 117 hace una interacción con el anillo de galactosa del ligando lo cual es esencial para la función del dominio RC. Por debajo del dominio RC se encuentra el dominio de Fibronectina tipo II (FN-II) de aproximadamente cuarenta residuos de longitud que contiene cuatro cisteínas conservadas involucrada en la formación de enlaces disulfuro. Este dominio participa en la unión a colágeno especialmente de los tipos I, II, III, IV (13).

El MRC1 cuenta con una tercera región extracelular que está compuesta de 8 dominios de lectinas tipo C (CTLD). De los 8 dominios CTLD solo del CTLD-4 al CTLD-8 están involucrados de manera directa en el reconocimiento de manosa, ya que su mutación selectiva bloquea la capacidad del receptor para la unión a su ligando (58). A través de estas regiones el MRC1 se une a ligandos de origen microbiano que contienen residuos de manosa; aunque también puede mediar el reconocimiento de fucosa, N- acetil glucosamina, lutropina, tiroglobulina, mieloperoxidasa e hidrolasas lisosomales. Esta capacidad de unir ligandos es dependiente de la presencia del ión Ca⁺⁺.

El resto de la proteína está constituida por un dominio transmembrana del tipo I y una porción intracelular de 45 aminoácidos que participa en la endocitosis desde la membrana plasmática vía vesículas recubiertas de clatrina hasta el sistema endosomal, lo cual es mediado por dos motivos en la porción citoplasmática del receptor que desencadenan distintas vías de transducción de señales (23).

En análisis hidrodinámicos realizados en ausencia de calcio, el MRC1 muestra una conformación extendida y monomérica con asimetría molecular, mientras que en presencia de calcio se observa un cambio en su coeficiente de sedimentación, por lo que se ha postulado que la formación de agregados podría estar implicada en su función fisiológica (37).

1.6.2 Expresión del receptor de la manosa

Se ha demostrado que el MRC1 se expresa en macrófagos tisulares, como son: las células de Kupffer, microglia perivascular, lámina propia, macrófagos dérmicos, peritoneales y alveolares. Sin embargo la expresión del MRC1 no está restringida a los macrófagos ya que también está presente en el endotelio hepático y linfático, células mesangiales glomerulares en los riñones, células del músculo liso de la tráquea y en el epitelio pigmentado de la retina (42).

La expresión del MRC1 puede ser regulada por citocinas del tipo Th1 como el interferón gamma (IFN- γ) que inhibe su expresión (61), así como por citocinas tipo Th2 como la interleucina (IL-4) que induce su expresión (41, 62). También se ha demostrado que otras citocinas como IL-13, IL-10, IFN- α , IFN- β y la prostaglandina E (PGE) inducen la expresión

del MRC1. Algunos agentes inmunosupresores como la dexametasona y la 1,25-dihidroxitamina D3 aumentan el nivel de expresión del MRC1 (59).

1.6.3 Papel biológico del receptor de la manosa

El receptor de manosa está implicado en procesos homeostáticos, tales como el acarreo de los productos endógenos como es el reconocimiento de lipoproteínas y la adhesión celular, así como en funciones inmunológicas como el reconocimiento de patógenos y la presentación de antígenos.

Al ser altamente expresado en células presentadoras de antígeno profesionales, el MRC1 juega un papel fundamental en el funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo. Como parte del sistema inmune innato el MRC1 a través de sus CTLDs ha sido involucrado en el reconocimiento y fagocitosis de una gran variedad de microorganismos patógenos como *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, la proteína gp120 del VIH, el lipoarabinomanano de las micobacterias, *Francisella tularensis*, *Leishmania* spp., el polisacárido capsular de algunas cepas de *Streptococcus pneumoniae* y la endotoxina de algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* (25).

En algunos estudios con ratones knock -out para el receptor de la manosa (RM-KO) se demostró que el MRC1 contribuye a la protección contra la enfermedad pulmonar causada por *Cryptococcus neoformans*, ya que se observó que los ratones RM-KO morían

rápidamente y tenían una muy alta carga fúngica en el pulmón después de 4 semanas de infección (19).

Los receptores de manosa se reciclan constitutivamente entre la membrana plasmática y los compartimentos endocíticos tempranos aun en ausencia de algún ligando. Se encuentran mayormente dentro de la vía endocítica. Solo el 15 % aproximadamente se encuentra en la superficie celular (52).

Mediante estudios por microscopia de fluorescencia se ha demostrado que el MRC1 intracelular es predominantemente expresado en endosomas tempranos, tanto en macrófagos sin tratamiento, como en macrófagos cultivados bajo condiciones sobre reguladas para la expresión del MRC1 (32). Sin embargo en otro análisis con macrófagos tratados con citocinas el MRC1 también se detectó en endosomas tardíos. Lo que sugiere que el rápido y constante reciclaje del receptor permite la sucesiva acumulación de los ligandos naturales o de los antígenos manosilados en compartimentos endocíticos intracelulares que le dan acceso para iniciar la vía de procesamiento antigénico para la presentación por MHC (53). En este sentido, un gran número de estudios apoya el papel que tiene el MRC1 de generar respuestas inmunes restringidas a MHC clase I y II, no solamente en la presentación de antígenos proteicos, ya que se ha demostrado que un antisuero de cabra anti- MRC1 fue capaz de bloquear la presentación del glicolípido LAM a células T CD1 específicas para LAM (26).

El MRC1 junto con otros receptores de señalización modula la secreción de citocinas. Esto se demostró en estudios con macrófagos alveolares humanos en donde se observó que

se requiere la expresión del MRC1 para la activación selectiva del NF- κ B en respuesta a *Pneumocystis carinii* (25). Otro trabajo del mismo grupo de colaboradores demostró que cuando células HEK-293 son transfectadas con el cDNA que codifica para receptor TLR-2 o con el cDNA que codifica para el MRC1 humano de manera independiente, no hay secreción de IL-8 en respuesta al estímulo con antígeno de *Pneumocystis carinii*, como ocurre cuando ambos receptores son co-expresados (69).

Sin embargo también se ha visto que el MRC1 al unirse a manano puede causar un efecto negativo en la producción de citocinas pro-inflamatorias ya que induce una sobre regulación de la cinasa IRAK-M, la cual regula negativamente la activación de los TLRs por un mecanismo dependiente del acoplamiento de MyD88 (37).

2. ANTECEDENTES

Diversas líneas de investigación incluyendo estudios de concordancia con gemelos, estudios comparativos de asociación genética a escala genómica, estudios de asociación con genes candidato, entre otros, sugieren que podría existir una base genética asociada con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa, en particular dichos factores genéticos podrían influenciar la progresión de la forma latente hacia la forma activa de la enfermedad (5). La incidencia de tuberculosis pulmonar activa (TBP) a diferentes tasas de prevalencia entre las diferentes razas, etnias y familias indica una predisposición genética a la susceptibilidad a Tb. La raza, los caucásicos y los mongoles, tienen una resistencia natural a la tuberculosis que permite que la infección no progrese tan fácilmente como en los individuos de raza negra, indios americanos o esquimales, debido a que éstos últimos son poblaciones recientemente expuestas a *Mycobacterium tuberculosis* (2). Las diferencias de exposición y de condiciones socioeconómicas son un factor a tener en cuenta para explicar dichas diferencias.

Los polimorfismos genéticos son una fuente de variación en el genoma, generalmente surgen por mutación en algunos individuos, y cuando no ponen en riesgo la viabilidad de los organismos, se transmiten a la descendencia adquiriendo cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Dichos polimorfismos pueden ser silenciosos (no cambian la secuencia primaria de las proteínas), o bien introducen cambios en las proteínas para las que codifican, proporcionando ventajas o desventajas para la adaptación de los individuos. Los polimorfismos más frecuentes en el genoma humano

son los cambios de una sola base en el ADN, también conocidos como polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (single nucleotide polymorphism)(31).

Dos polimorfismos (-871A/G y-336A/G) localizados en la región promotora del gen que codifica para el receptor DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), una proteína transmembrana de tipo II que se expresa en células dendríticas, fueron analizados en dos poblaciones independientes (Canadienses caucásicos e indígenas africanos), encontrándose una asociación estadísticamente significativa de las variantes -871A/G y-336A/G con el desarrollo de TBP en esta población (54).

También se han realizado diversos análisis de polimorfismos en genes que codifican para receptores tipo toll (TLRs), los cuales son mediadores críticos de la respuesta inmune para hacer frente a una gran variedad de patógenos, incluyendo *M. tuberculosis* (70). En el caso del polimorfismo R753Q en el receptor TLR2, éste parece influenciar la progresión de la infección con *M. tuberculosis* a la enfermedad activa en niños (55). Otro SNP en este mismo receptor (597T/C) fue encontrado fuertemente asociado al desarrollo de TB meníngea y miliar en pacientes de Vietnam (73). Por otra parte, a pesar de que el polimorfismo D299G del receptor TLR4 no se observó asociado con Tb pulmonar en esta población vietnamita, esta misma variante fue encontrada asociada al desarrollo de Tb como un factor de riesgo en pacientes VIH positivos en Tanzania y España (24,54).

También se han analizado polimorfismos presentes en genes que codifican para lectinas solubles tipo C como la proteína surfactante A y D (SP-A y SP-D) y la lectina de unión a

Manosa (MBL). SP-A y SP-D son colectinas que participan en la respuesta sistema inmune innata en pulmón para diversos patógenos, incluyendo *M. tuberculosis*. Estudios en pacientes reclutados en un Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México demostraron que variaciones alélicas en ambas (SP-A y SP-D) tienen influencia en la susceptibilidad del hospedero al desarrollo de TBP. Otros polimorfismos como son el 1416C/T y 1382C/G ubicados en intrones de los genes SP-A1 y SP-A2, respectivamente, se han encontrado asociados al desarrollo de TBP en una población hindú (40).

Los estudios genéticos realizados hasta el momento para observar asociación entre SNPs y tuberculosis también incluyen el análisis de polimorfismos en genes que codifican para citocinas o quimiocinas. Una citocina proinflamatoria involucrada fuertemente en la respuesta inmune protectora en la TBP es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Dos SNPs en la región promotora del gen *tnf* (-238G/A y -308G/A) han sido ampliamente estudiados, encontrándose en una población colombiana el SNP -238G/A asociado al desarrollo de Tuberculosis pulmonar (16), aunque en una población iraní este mismo polimorfismo no resultó estadísticamente asociado al desarrollo de la enfermedad. En otro estudio se analizó el SNP -308G/A en una población colombiana y una de Irán, encontrándose asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de TBP, sin embargo dicho polimorfismo no resultó asociado en una población coreana. (50).

El gen que codifica a la IL-12 también ha sido ampliamente estudiado en busca de polimorfismos asociados a Tb. La IL-12 juega un papel importante en la respuesta inmune ya que dirige la diferenciación de las células Th1, favoreciendo la producción de INF- γ por las células TCD4⁺. Se han reportado resultados discrepantes en diferentes poblaciones al

analizar polimorfismos en el gen que codifica para esta citocina y su asociación con Tb. Varios polimorfismos en IL-12B ubicados en intrones, región promotora o región 3'-UTR se encontraron asociados al desarrollo de Tb en algunos estudios (44,74) pero no en otros (6,39), lo que pone en evidencia que la contribución genética a la susceptibilidad para el desarrollo o progresión de la enfermedad podría tener una base poblacional.

El gen *mrc1*, que codifica para el Receptor de manosa humano, se encuentra en el cromosoma 10p12 y consiste en 30 exones. Se han descrito pocos estudios sobre polimorfismos genéticos presentes en el gen *mrc1* y su asociación con enfermedades humanas. Uno de ellos fue un estudio realizado por Hattori y colaboradores en el año 2009, en el que se analizó la asociación genética de polimorfismos en el gen *mrc1* en una población japonesa y una población afroamericana con el desarrollo de asma, encontrándose que cinco SNPs de este gen estaban asociados al desarrollo de asma, entre ellos el SNP G396S; en contraste, en la población de individuos afroamericanos no se encontró asociación estadísticamente significativa con la presencia de esta enfermedad (28).

Otra enfermedad que se ha vinculado a polimorfismos en el gen *mrc1* es la sarcoidosis, una enfermedad granulomatosa sistémica en la que se presenta una respuesta inmune celular exacerbada. Hattori et al., en el año 2010 analizaron muestras de ADN de 181 sujetos japoneses con sarcoidosis, encontrando que el SNP rs691005 estaba asociado a sarcoidosis como un factor de riesgo ($P=0.001$; OR= 2.53).

En otro estudio Alter y colaboradores en el año 2010 analizaron muestras de ADN de individuos con lepra de nacionalidad vietnamita, encontrando que entre los seis SNPs analizados, el SNP G396S se asoció estadísticamente a la presencia de lepra ($P=0.035$; OR= 0.76) como un factor protector, mientras que en pacientes con lepra de nacionalidad brasileña este mismo SNP (G396S) se asoció estadísticamente a la enfermedad como un factor de riesgo ($P=0.035$; OR= 1.34). Así mismo, el SNP L407F (también ubicado en el exón 7 del gen *mrc1*) se encontró polimórfico en esta población latina, y asociado estadísticamente a la enfermedad como un factor protector ($P=0.035$; OR= 0.75), mientras que en la población asiática no se encontró polimórfico (5). Con el objetivo de validar el reporte de asociación genética del SNP G396S, Wang y colaboradores en el año 2012 genotipificaron sin éxito 12 variantes genéticas del gen *mrc1* en 527 pacientes con lepra de origen chino (76). Considerando el hecho de que la lepra y la tuberculosis son enfermedades causadas por micobacterias podría sugerirse que SNPs en el exón 7 del gen *mrc1* podrían afectar también la susceptibilidad de la población a la tuberculosis pulmonar.

Zhang y colaboradores en el año 2012 realizaron un estudio en el que incluyeron 222 pacientes con tuberculosis pulmonar activa reclutados en hospitales de las provincias de Shaoxing y Hangzhou en China, y mediante la técnica de PCR y secuenciación analizaron seis SNPs localizados en el exón 7 del gen *mrc1*. Ellos encontraron que para los SNPs G1195A, T1212C, C1221G, C1303R y C1323T la distribución de los genotipos entre el grupo de pacientes con Tb Pulmonar y los individuos del grupo control no presenta una diferencia estadísticamente significativa. Mientras que el polimorfismo G396S con un

valor de P de 0.037 fue asociado a tuberculosis con un OR de 0.76 lo que indica que está asociado a tuberculosis con una función protectora (79).

En otro estudio más reciente de Zhang et al. en el que analiza muestras de 2 poblaciones de origen chino (Uygur y Kazak) situadas en diferentes áreas geográficas de Asia se encontró que el SNP G396S ($P=0.033$; OR= 1.64) en la población Uygur está asociado a tuberculosis pulmonar como un factor de riesgo; mientras que en la población china Kazak ningún SNP analizado resultó asociado a tuberculosis pulmonar (80). Lo anterior sugiere que los factores genéticos juegan un papel importante en la susceptibilidad particular de una población al desarrollo de enfermedades infecciosas como la TP. El hallazgo de los resultados discrepantes entre la asociación de polimorfismos en el *mrc1* (exón 7) en las diferentes poblaciones analizadas dificulta su generalización.

3. JUSTIFICACION

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de evolución crónica que se mantiene latente en la mayoría de los casos, pero que progresa rápidamente a la forma activa cuando el individuo presenta mutaciones puntuales en genes que codifican para citocinas como la IL-12 o el receptor para IFN- γ , en cuyo caso los individuos también son susceptibles a micobacteriosis (infección por micobacterias no tuberculosas).

El efecto de otras variaciones genéticas en los pacientes con tuberculosis pulmonar, como son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) están poco estudiadas en población mexicana, en particular no hay estudios acerca de la posible asociación de SNPs en el receptor de manosa y la tuberculosis pulmonar.

4. HIPÓTESIS

Polimorfismos del gen que codifica al receptor de manosa (CD206) están posiblemente asociados con la tuberculosis pulmonar.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar la variabilidad en el gen que codifica al receptor de manosa (CD206) y su posible asociación con la tuberculosis pulmonar.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las frecuencias alélicas en la población para los polimorfismos 1188a/g, (G39S); 1197g/a, (T399A) y 1221c/g, (L407F) localizados en el exón 7 del gen *mrc1*.
2. Identificar individuos con tuberculosis pulmonar activa (diagnóstico microbiológico) y determinar las frecuencias alélicas para los polimorfismos 1188a/g, (G396S); 1197g/a, (T399A) y 1221c/g, (L407F) localizados en el exón 7 del gen *mrc1*.
3. Determinar si existe una asociación estadísticamente significativa entre la distribución de los genotipos con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

A) MATERIAL Y EQUIPO

El acetato de sodio, agarosa, bromuro de etidio, cloruro de sodio (NaCl), EDTA, Etanol, Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico, Isopropanol absoluto, Sacarosa, SDS Tris, Tritón 100 X se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El agua libre de nucleasas y el agua Mili Q fueron adquiridas de Qiagen N.V (Hilden, Alemania). Los DNTPs, el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y la enzima Biolase DNA polimerasa se adquirieron a través de Bioline USA Inc (Boston, MA, E.U.A.). El marcador de peso molecular Invitrogen Trac kit 100 bp DNA ladder fue adquirido de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, E.U.A.). La enzima de restricción EcoR1 empleada fue adquirida de New England BioLabs (Ipswich, MA, E.U.A.) Los iniciadores Forward: 5'- AGTGATGTGTGTCCTACTCA-3, Reverse: 5'- GTGCTCCAGGATTAAGCC-3' y los iniciadores alelo específicos (Tabla 2) fueron adquiridos de Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada). Los microtubos para PCR 0.6 ml y tubos Eppendorff de 1.5 ml fueron adquiridos de la marca Eppendorf (Hamburg, Alemania).

EQUIPOS

Se empleó un Agitador Vortex-T Genie 2 el cual se adquirió de Scientific Industries, Inc (Bohemia, NY, E.U.A). La microcentrífuga fue adquirida de la marca Eppendorf (Hamburg, Alemania). La Fuente de poder empleada para la electroforesis fue marca Enduro adquirida a través de Labnet International Inc (Edison,NJ, E.U.A.) Se empleó un Nano Drop

2000 Espectrofotómetro UV-Vis, cámara de electroforesis horizontal, fotodocumentador MultiDoc-it Imaging system UVP que fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, E.U.A.) El Termociclador C1000 Touch Thermal Cycler con módulo dual 48/48 de reacción rápida utilizado fue adquirido de BioRad (Hércules, CA, E.U.A.).

B) MÉTODOS:

Población de estudio. Se incluyeron individuos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar atendidos en el Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones respiratorias (CIPTIR) del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en Monterrey N.L., México, entre diciembre 2013 y agosto del año 2014. El diagnóstico de tuberculosis pulmonar fue realizado de acuerdo a los criterios establecidos en la NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, para la prevención y control de la tuberculosis. En todos los casos se confirmó el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo en medio de Löwenstein–Jensen. El grupo control estuvo conformado por individuos clínicamente sanos, catalogados como sujetos aptos para donación en banco de sangre, HIV negativos, residentes de la zona metropolitana de Monterrey.

Este estudio fue realizado con la aprobación del Comité de ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y cuenta con el número de registro MB13-001. Todos los pacientes que accedieron a formar parte del estudio firmaron un consentimiento informado de su participación, llenaron una encuesta de 34 preguntas para recabar datos sociodemográficos, clínicos y heredofamiliares de interés para el estudio (Anexo 1).

Extracción de DNA genómico a partir de sangre completa mediante la técnica de TSNT.

Se tomó una muestra de sangre de 5 ml en un tubo con EDTA como anticoagulante por cada paciente. Para llevar a cabo la extracción del DNA genómico, las muestras de sangre completa fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 5 minutos para la separación del paquete globular de la fase líquida. La interfase conteniendo los glóbulos blancos se transfirió a microtubos Eppendorf con capacidad de 2 mL con ayuda de una pipeta Pasteur. Se añadió solución de lisis para eritrocitos [Tris-HCl 100mM pH 8, Tritón 100 X- 1 %, Sacarosa 11%] en una proporción 1:5 v/v y se mezcló mediante vórtex suave. Después de incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, invirtiendo ocasionalmente los microtubos con glóbulos blancos, estos fueron centrifugados a máxima velocidad durante 20 segundos. El sobrenadante fue descartado y se añadió 150 µL de solución salina 0.85% (p/v) a cada pellet de glóbulos blancos para después resuspender con vórtex suave. Posteriormente se transfirieron 50 µL a un tubo de 2 mL y se agregaron 300 µL de solución amortiguadora de lisis TSNT [Tritón 100 2X, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8] para después homogenizar la suspensión por vórtex suave. A cada microtubo se agregaron 300 µL de TE 1X [Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM] y se resuspendieron por vórtex suave. Posteriormente fueron añadidos 350 µL de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico [25:24:1, v/v/v], para después agitar vigorosamente hasta que se homogenizaron completamente. Después cada microtubo fue incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugado por 10 min a 13 000 rpm. En seguida se transfirió la fase acuosa a otro microtubo de 2 mL y se realizó de nueva cuenta la extracción con 350 µL de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico [25:24:1, v/v/v], de la

manera ya descrita anteriormente. Posteriormente 400 μl de la fase acuosa fueron transferidos a un microtubo nuevo al que se añadieron 40 μl (10%) de acetato de sodio 3M. Al volumen total obtenido se agregaron 360 μl de isopropanol absoluto frío para favorecer la precipitación del DNA. Después el contenido de cada microtubo se mezcló suavemente por inversión hasta que se observó la hebra blanca de DNA. Después de incubar a -20°C durante 15-20 min., los microtubos fueron centrifugados por 10 min a 13 000 rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se agregó 1 mL de etanol al 70% (frío) a cada microtubo para después mezclar por vórtex suave y centrifugar por 15 min a 13 000 rpm. El sobrenadante fue decantado y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente se re-suspendió la pastilla de ADN en 50 μL de TE 1X pH 8 [Tris-HCl 100mM-EDTA 100mM-H₂O MQ] y se incubó durante 1 hora a 37°C para facilitar la solubilización del ADN genómico.

Cuantificación de DNA genómico por espectrofotometría. El DNAg fue cuantificado mediante espectrofotometría leyendo la absorbancia de cada una de las muestras a 260 nm en el equipo Nano Drop 2000 Espectofotómetro UV-Vis de la casa comercial Thermo Scientific contra un blanco de TE 1X. Para asegurar la integridad del DNA se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (m/v) y la visualización de su corrimiento electroforético se puso en evidencia mediante la tinción con bromuro de etidio [$2\mu\text{g}/\text{ml}$]. El DNA fue almacenado hasta su uso a -20°C .

Análisis por RFLPs del SNP L407F del gen *mrc1*. Se diseñaron iniciadores de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar una región de 233 pares de bases que corresponde íntegramente al exón 7 del gen *mrc1*. La secuencia de los iniciadores es la

siguiente: Forward: 5'- AGTGATGTGTGTGCCTACTCA-3 Reverse: 5'- GTGCTCCCAGGATTAAGCC-3'. El producto amplificado incluye a 3 SNPs en una pequeña región de 37 pares de bases, de los cuales uno que corresponde al codón 407 (L/F) posee un sitio de restricción para la enzima de restricción *EcoR1*, lo que permite su caracterización por PCR-RFLP. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl incluyendo 1.5mM MgCl₂ 300µM dNTPS, 0.5µM de cada iniciador, 1.25 U de Taq DNA polimerasa y su buffer correspondiente. El programa del termociclador consistió en un ciclo de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 seg, 53°C por 45 seg y 72°C por 45 seg. y un ciclo final de 5 min a 72°C. Posteriormente los productos de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.2%.

Los productos amplificados de 233 pb fueron digeridos con la enzima de restricción *Eco R1* [GAATT/C,] durante 12 hrs a 37°C. Esta enzima de restricción nos permitió diferenciar entre los 2 alelos en el codón 407, ya que el alelo "c" presenta el sitio de restricción para la enzima, mientras que este sitio se pierde en el alelo variante "g". Por lo anterior, en la digestión enzimática con *Eco R1*, una muestra de un individuo homocigoto para el alelo "c" (cc) se obtienen 2 fragmentos, uno de 78pb y otro de 151pb. Mientras que en el caso de individuos homocigotos para el alelo "g" (gg) posterior a la digestión enzimática se mantiene la banda íntegra de 233 pares de bases, ya que éste alelo no presenta el sitio de restricción. El DNA digerido con *EcoR1* de los individuos heterocigotos (cg) resulta en 3 fragmentos: 78, 151 y 233 pb. Los fragmentos de la digestión fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, teñidos con bromuro de etidio, y digitalizados en un fotodocumentador MultiDoc-it Imaging system UVP de la casa comercial Fisher

Scientific con lámpara ultravioleta. Una muestra de DNA sin digerir fue incluida durante la electroforesis como control en todos los casos.

Análisis de los SNPs G396S y T399A mediante el uso de iniciadores alelo-específicos. El análisis de los SNPs G396S y T399A se llevó a cabo mediante PCR usando iniciadores alelo-específicos ya que para la identificación de los alelos de estos SNPs no se cuenta con sitios de restricción informativos. Estos iniciadores alelo-específicos fueron diseñados de manera que cada uno genera un producto amplificado de diferente tamaño para permitir su identificación inequívoca. La secuencia del iniciador FORWARD utilizado, común a todos los alelos fue: 5'- AGTGATGTGTGTGCCTACTCA-3, mientras que los iniciadores REVERSE alelo-específicos para identificar cada una de las variantes posibles se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores alelo específicos

Secuencia Iniciador (5'→3')	Nombre	Producto amplificado (pb)
GATACTCGTGAGGTCAct	MRC1- 7RvS	138
CCTCGATGGTGTGGATACTc	MRC1- 7RvA	151
GATACTCGTGAGGTCACc	MRC1- 7RvG	138
CCTCGATGGTGTGGATACTt	MRC1- 7RvT	151

Análisis estadísticos. Se utilizó la prueba de chi cuadrada para comparar la distribución alélica y distribución de genotipos entre los pacientes con Tb pulmonar y los individuos del grupo control por el método de la prueba exacta de Fisher con 2 colas utilizando el

programa estadístico Graph Pad Prism versión 5.0. El odds ratio (OR) y el intervalo de confianza (CI) fueron calculados. El valor de OR es usado para estimar el riesgo relativo. Si el valor de OR es igual a 1 esto indica que el factor no tiene efecto en la incidencia de la enfermedad. Si el valor de OR es más grande que 1 esto indica que el factor es un riesgo para la incidencia de la enfermedad. Si el valor de OR es menor que 1 esto indica que el factor es protector. En cuanto a la frecuencia de los haplotipos, ésta fue estimada mediante el programa computacional SNPstats.

7. RESULTADOS

1.- Determinación de las frecuencias alélicas de los SNPs del exón 7 del gen *mrc1*.

Para calcular las frecuencias alélicas en la población de estudio, se empleó un banco de DNA genómico (N=155) conformado por donadores sanos integrado por 60 mujeres (39%) y 95 hombres (61%).

Mediante el uso de los iniciadores diseñados (Forward: 5'- AGTGATGTGTGTGCCTACTCA-3' Reverse: 5'-GTGCTCCCAGGATTAAAGCC-3') se obtuvo un producto amplificado consistente en una sola banda de 233 pb, correspondiente íntegramente al exón 7 del gen *mrc1*, el cual al ser digerido con la enzima *EcoRI* generó los patrones de digestión esperados, como se describe en la Figura 2. Así mismo, mediante el uso de los iniciadores alelo específicos descritos en la Tabla 2 se generó una sola banda para cada uno de los SNPs, de 151pb para el SNP T399A y de 138pb para el SNP G396S como se muestra en la Figura 3.

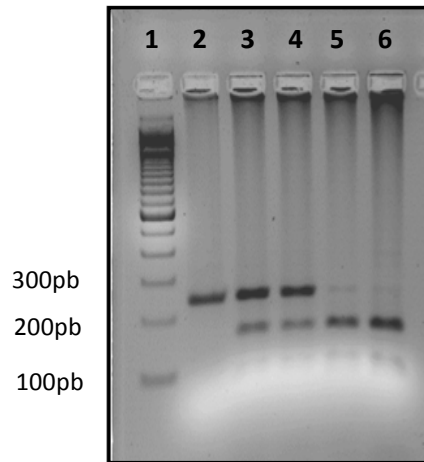


Figura 2. Patrones de digestión esperados después de la digestión del exón 7 del gen *mrc1* con *EcoR1*. Gel de agarosa al 2.5%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: homocigoto “gg”, carril 3: heterocigoto “cg”, carril 4: heterocigoto “cg”, carril 5: homocigoto “cc”, carril 6: homocigoto “cc”.

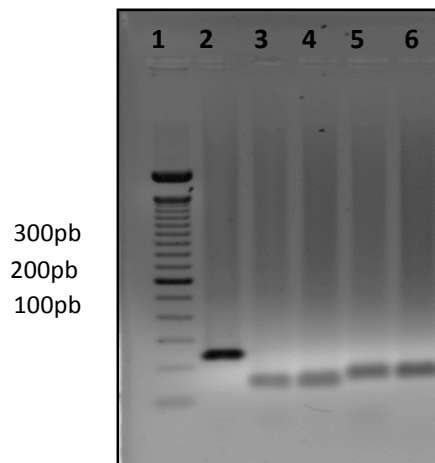


Figura 3. Patrones electroforéticos esperados con iniciadores alelo específicos para los SNPs G396S y T399A. Gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: amplificado del exón 7 del gen *mrc1*, carril 3: amplificado de alelo S (S396), carril 4: amplificado de alelo G (G396), carril 5: amplificado de alelo T (T399), carril 6: amplificado de alelo A (A399).

Para el SNP L407F se encontró que el alelo “c” tuvo una frecuencia 0.88, mientras que el alelo “g” tuvo una frecuencia de 0.12 en la población analizada. Para el SNP G396S fue de 0.43 para el alelo “a” y 0.57 para el alelo “g”. En el caso del SNP T399A el alelo “g” estuvo presente en 47 % del total de los individuos con una frecuencia de 0.47, mientras que el alelo “a” mostró una frecuencia de 0.53.

De acuerdo con los datos de las frecuencias alélicas encontradas para los 3 SNPs no sinónimos del exón 7 del gen *mrc1*, se puede concluir que en la población analizada el gen *mrc1* en estas 3 posiciones se encontró polimórfico, a diferencia de lo reportado previamente en una población china en la cual el gen *mrc1* en la posición 407 no se encontró polimórfico (79). Mientras que en esa misma población de nacionalidad china las frecuencias alélicas para el alelo “g” y el alelo “a” del SNP G396S fueron 0.526, y 0.474 respectivamente. En otro estudio en donde analizaron muestras de individuos de nacionalidad vietnamita los SNPs L407F y T399A se encontraron no polimórficos (5).

La distribución de los alelos para estos 3 SNPs (L407F, G396S y T399A) en este grupo de individuos control cumplió con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

2.- Conformación de los grupos de casos y controles.

De diciembre del año 2013 al mes de agosto del año 2014 se atendieron 65 pacientes con Tb pulmonar en el Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones respiratorias (CIPTIR; Colaboración con el Dr. Med. Luis Adrián Rendón Pérez) del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en Monterrey N.L., los cuales accedieron a formar parte del estudio a través de la firma del consentimiento informado. A cada uno de

ellos se solicitó una muestra de sangre venosa, de la cual se extrajo la porción de células mononucleares de sangre periférica, para posteriormente realizar la extracción de DNA mediante la técnica de extracción con fenol-cloroformo. Una vez extraídos los DNAs, éstos fueron cuantificados y visualizados en un gel de agarosa para comprobar su integridad. De esta manera se integró el banco de DNAg de pacientes con Tb pulmonar con el que se trabajó en este estudio. Todos los pacientes incluidos presentaron diagnóstico clínico y conformación bacteriológica de infección pulmonar con *Mycobacterium tuberculosis*.

Del total de los 65 pacientes con Tb pulmonar incluidos en este estudio la media de la edad fue de 41 años, con un rango de 19 a 58 años. Se incluyeron al menos 2 pacientes de cada edad representada en ese rango. El grupo control estuvo integrado por sujetos 96 sanos, el rango de edad fue de 19 a 60 años y la media de la edad fue de 40 años. Como se puede observar en la Figura 4 la media de la edad en ambos grupos no presenta diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.2325$).

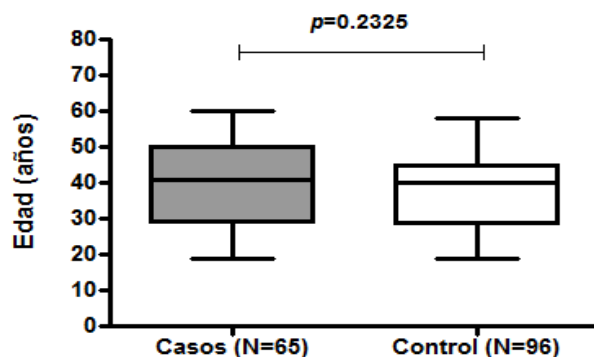


Figura 4. Comparativa de la edad entre casos (TBP) y controles. La barra sombreada indica el rango de edad en los casos TBP (19-58 años) y la media de la edad en este grupo: 41 años. Mientras que la barra clara indica el rango de edad en los individuos del grupo control (19-60 años) y la media: 40 años. No existe diferencia significativa en las edades de estos dos grupos ($P= 0.2325$).

De los 65 pacientes con Tb pulmonar el 40 % es de sexo femenino y el 60% corresponde al sexo masculino. Ésta misma proporción de género se mantiene dentro del grupo control. Del total de los pacientes con TBP, el 40% (26/65) tiene una historia familiar de Tb, el 83% (54/65) de éstos recibieron la vacuna BCG, el 39% (25/65) son diabéticos y el 74% (48/65) refiere que es la primera vez que le diagnostican tuberculosis pulmonar. El número de individuos en el grupo control fue reducido a 96 debido a que se incluyeron en el análisis posterior solamente a los individuos cuya edad estuviera representada en el rango de edad del grupo de pacientes, incluyéndose al menos 2 individuos de la misma edad (Tabla 3).

Tabla 3. Características de controles sanos y pacientes con Tb pulmonar.

	Tb pulmonar N=65	Controles N=96	P *
Edad (media)	41	40	0.2325
Rango (min-max)	(19 - 58) años	(19 - 60) años	-
Género (Fem:Masc)	26(40%):39(60%)	38(40%):58(60%)	-
Historia familiar con Tb	26(40%)	ND	-
Vacunación con BCG	54(83%)	ND	-
Diabetes	25(39%)	ND	-
Tb por primera vez	48(74%)	ND	-

*Prueba de *t* no pareada con corrección de Welch

ND =No determinado

3. Asociación genética del polimorfismo L407F (gen *mrc1*) con tuberculosis pulmonar.

Al analizar las frecuencias alélicas para el SNP L407F se encontró que el alelo más frecuente fue el alelo “c” tanto en hombres como mujeres para ambos grupos de estudio, como puede verse en la Tabla 4. También se realizó el análisis de la distribución de los alelos tanto en el grupo de casos como en el del grupo control, diferenciando por sexo, pero no se encontró diferencia significativa ($P>0.05$), como puede verse en la Tabla 4. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias alélicas en el grupo de casos (Tb pulmonar) y el grupo-control ($P= 0.8426$) (Tabla 5).

Tabla 4. Frecuencias alélicas para L407F en Hombres y Mujeres.

SNP ID	Posición relativa	DNA	Proteína	Codón	Alelo	Grupo control		Grupo Tb pulmonar		P*
						Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	
Rs2437257	1221	c/g	F	407	c	105 (0.91)	68 (0.89)	71 (0.91)	47 (0.9)	0.8128
			L		g	11 (0.09)	8 (0.11)	7 (0.09)	5 (0.1)	0.8128

*Prueba Chi². Prueba exacta de Fisher de 2 colas. $P= <0.05$

Tabla 5. Frecuencias alélicas para L407F en el grupo control y el grupo casos TBP.

SNP ID	Posición relativa	DNA	Proteína	Codón	Alelo	Controles	Casos (TBP)	$P < 0.05$
Rs2437257	1221	c/g	F	407	c	173 (0.9)	118 (0.91)	$P > 0.05$
			L		g	19 (0.1)	12 (0.09)	

*Prueba Chi². Prueba exacta de Fisher de 2 colas. $P = < 0.05$

La distribución de las frecuencias genotípicas encontradas en el grupo control fueron 0.802 (c/c), 0.198 (c/g) y 0 (g/g), mientras que en el grupo de Casos con Tb pulmonar fueron 0.816, 0.184 y 0 respectivamente. En el análisis estadístico de la distribución de los genotipos entre el grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar y el grupo control no se observó una diferencia significativa ($P > 0.05$). De igual manera se analizó la distribución de los genotipos diferenciando entre hombres y mujeres, sin encontrarse una diferencia estadísticamente significativa entre los sexos ($P > 0.05$) Tabla 6.

Tabla 6. Distribución de genotipos del SNP L407F y asociación con Tb pulmonar.

SNP ID	Posición relativa	Nucleótido	Genotipo	Controles	Casos (TBP)	$P < 0.05$	Odds Ratio (95% CI)
Rs2437257	1221	c/g	c/c	77(80.2%)	53(81.5%)	0.8337	1.090 (0.4882-2.433)
			c/g	19(19.8%)	12(18.4%)	0.8337	0.9176 (0.4110-2.048)
			g/g	0	0	-	-

*Prueba Chi². Prueba exacta de Fisher de 2 colas. $P = < 0.05$

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el gen *mrc1* es polimórfico en la posición 407 en nuestra población, a diferencia de dos poblaciones asiáticas como Vietnam y China (5,80) en donde se encontró no polimórfico. Sin embargo en una población latina como es el caso de individuos brasileños, este gen se observó polimórfico en la posición 407. En ese estudio se analizaron muestras de pacientes con Lepra, la cual es una enfermedad también causada por una micobacteria. En esta población brasileña se encontró que el SNP L407F se asoció a lepra y puede tener una función protectora ($P=0.035$; $OR=0.75$)(5).

4. Asociación genética del polimorfismo G396S (gen *mrc1*) con tuberculosis pulmonar.

Para el análisis de los SNPs G396S y T399A todas las muestras fueron amplificadas utilizando iniciadores alelo específicos.

Se realizó el análisis de la distribución de los alelos para el SNP G396S tanto en el grupo de pacientes como en el del grupo control diferenciando por sexo y no se encontró diferencia significativa ($P>0.05$) Tabla 7. No se observó una diferencia significativa en la frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con Tb pulmonar y el grupo de individuos control ($P=0.2888$) Tabla 8.

Tabla 7. Frecuencias alélicas para G396S en Hombres y Mujeres.

SNP ID	Posición relativa	DNA	Proteína	Codón	Alelo	Grupo control		Grupo Tb pulmonar		P<0.05
						Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	
Rs1926736	1188	a/g	S	396	a	48(0.41)	35(0.46)	38(0.49)	26(0.5)	P>0.05
			G		g	68 (0.59)	41(0.54)	40(0.51)	26(0.5)	

*Prueba Chi ²: Prueba exacta de Fisher de 2 colas. P= <0.05

Tabla 8. Frecuencias alélicas para G396S en el grupo control y el grupo casos TBP.

SNP ID	Posición relativa	DNA	Proteína	Codón	Alelo	Controles	Tb pulmonar	P< 0.05
Rs1926736	1188	a/g	S	396	a	83(0.43)	64(0.49)	0.2888
			G		g	109(0.57)	66(0.51)	

*Prueba Chi ²: Prueba exacta de Fisher de 2 colas. P= <0.05

Para el SNP G396S los genotipos a/a, a/g y g/g en la población control fueron encontrados en un 11.5, 63.5 y 25 por ciento respectivamente. Mientras que en el grupo de pacientes con Tb pulmonar la distribución de éstos genotipos fue de 10.8, 76.9 y 12.3 por ciento. El genotipo g/g fue más frecuentemente encontrado en el grupo de individuos control. Éste

genotipo resultó asociado a tuberculosis pulmonar ($P= 0.0477$;OR= 0.4211;95%CI 0.1759-1.0) con una posible función protectora. No se encontró diferencia significativa en la distribución de los genotipos a/a y a/g entre el grupo de individuos control y el grupo de pacientes con Tb pulmonar ($P>0.05$).Tabla 9.

De la misma manera que en este trabajo, el SNP G396S anteriormente se ha encontrado polimórfico; tal es el caso de poblaciones de nacionalidad china, vietnamita y brasileña. Este SNP fue asociado a tuberculosis pulmonar con una función protectora en una población china con una significancia de $P= 0.037$ y un OR=0.76 (80). Mientras que en una población vietnamita el SNP G396S resultó asociado a lepra con una función protectora ($P= 0.035$;OR=0.76). A diferencia de pacientes con lepra de nacionalidad brasileña en donde este SNP se encontró asociado a Lepra como un factor de riesgo ($P= 0.035$;OR=1.34)(5).

Tabla 9. Distribución de genotipos del SNP G396S y asociación con Tb pulmonar.

SNP ID	Posición relativa	Nucleótido	Genotipo	Controles	Casos (TBP)	$P < 0.05$	Odds Ratio (95% CI)
Rs1926736	1188	a/g	a/a	11(11.5%)	7(10.8%)	0.8917	0.9326 (0.3414-2.548)
			a/g	61(63.5%)	50(76.9%)	0.0718	1.913 (0.9331-3.8)
			g/g	24(25%)	8(12.3%)	0.0477*	0.4211 (0.1759-1.0)

*Prueba Chi² Prueba exacta de Fisher de 2 colas. $P= <0.05$

5. Asociación genética del polimorfismo T399A (gen *mrc1*) con tuberculosis pulmonar.

Para el SNP T399A los alelos a/ g se encontraron distribuidos de igual manera (0.5 y 0.5).

Se realizó el análisis de la distribución de los alelos para el SNP T399A tanto en el grupo de pacientes como en el del grupo control diferenciando por sexo y no se encontró diferencia significativa ($P>0.05$). También se observó que los alelos a/ g se encontraron distribuidos de igual manera (0.5 y 0.5) Tabla 10. No se observó una diferencia significativa en la frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con Tb pulmonar y el grupo de individuos control ($P= 0.6464$) Tabla 11.

Tabla 10. Frecuencias alélicas para T399A en Hombres y Mujeres.

SNP ID	Posición relativa	DNA	Proteína	Codón	Alelo	Grupo control		Grupo Tb pulmonar		P<0.05
						Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	
Rs2478577	1197	g/a	A	399	g	56(0.48)	35(0.46)	39(0.5)	26(0.5)	P>0.05
			T		a	60 (0.52)	41(0.54)	39(0.5)	26(0.5)	

*Prueba Chi ² Prueba exacta de Fisher de 2 colas. P= <0.05

Tabla 11. Frecuencias alélicas para T399A en el grupo control y el grupo casos TBP.

SNP ID	Posición relativa	DNA	Proteína	Codón	Alelo	Controles	Tb pulmonar	<i>P</i> < 0.05
Rs2778577	1197	g/a	A	399	<i>g</i>	91 (0.47)	65 (0.5)	0.6464
			T		<i>a</i>	101 (0.53)	65 (0.5)	

*Prueba Chi² Prueba exacta de Fisher de 2 colas. *P*= <0.05

La distribución de los genotipos *g/g*, *g/a* y *a/a* del SNP T399A en el grupo de individuos control fue en un 1, 92.7 y 6.3 por ciento respectivamente. Mientras que en el grupo de pacientes con Tb pulmonar el único genotipo presente fue el de los heterocigotos (*g/a*). En el análisis de la distribución de los genotipos entre el grupo de individuos control y el grupo de pacientes con Tb pulmonar el genotipo *g/a* fue encontrado más frecuentemente en el grupo de pacientes con Tb pulmonar. Este genotipo resultó asociado a tuberculosis pulmonar como un factor de riesgo (*P*= 0.0260; OR= 10.98; 95% CI 0.6155-195.8). Mientras que el genotipo *a/a* resultó asociado a Tb pulmonar con una posible función protectora (*P*= 0.0400; OR= 0.1063; 95% CI 0.005879-1.921). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la distribución del genotipo *g/g* entre el grupo de pacientes con Tb pulmonar y el grupo control (*P*= 0.4091). Tabla 12.

Tabla 12. Distribución de genotipos del SNP T399A y asociación con Tb pulmonar.

SNP ID	Posición relativa	Nucleótido	Genotipo	Controles	Casos (TBP)	$P < 0.05$	Odds Ratio (95% CI)
Rs2478577	1197	g/a	g/g	1 (1%)	0	0.4091	0.4860 (0.01948-12)
			g/a	89(92.7%)	65(100%)	0.0260*	10.98 (0.6155-195.8)
			a/a	6(6.3%)	0	0.0400*	0.1063 (0.005879-1.921)

*Prueba Chi²; Prueba exacta de Fisher de 2 colas. $P = < 0.05$

El SNP T399A solo se ha estudiado en una población vietnamita en donde se encontró no polimórfico (5). No hay reportes de éste SNP asociado a alguna otra enfermedad.

6. Estimación de la frecuencia de haplotipos.

Para llevar a cabo una estimación de la frecuencia de haplotipos se utilizó el programa estadístico SNPstats (45), fijando la variable “respuesta” a la pertenencia al grupo (Casos/Controles), y empleando como co-variable categórica el sexo (Hombre/Mujer), y como co-variable cuantitativa a la edad. Se estableció el 1% (0.01) como punto de corte para la estimación de haplotipos poco frecuentes en la muestra analizada (N= 161).

Se construyeron seis haplotipos posibles, de los cuales los primeros tres haplotipos mostrados en la Tabla 13 constituyen los más frecuentes, representando en su conjunto el 81.53 % del total de los haplotipos encontrados en la población analizada (N= 161).

El haplotipo más frecuente (36.81%) se encontró diferencialmente representado en ambos grupos, ya que en el grupo de casos (TBP) se encontró con una frecuencia del 49.21%, mientras que en el grupo control se encontró con una frecuencia de 24.57%, lo que pudiera indicar que éste haplotipo (agc/SAF) se encuentra asociado a tuberculosis pulmonar como un factor de riesgo. Por otra parte el tercer haplotipo más frecuente (11.63%) se encontró mayoritariamente representado en el grupo control (12.93%) comparado con un 3.04% en el grupo de pacientes con TBP, lo que sugiere que este haplotipo (ggc/GAF) estaría asociado a tuberculosis pulmonar con un efecto protector.

El segundo haplotipo más frecuente (33.09%) presentó una distribución comparable entre ambos grupos. Otros haplotipos minoritarios encontrados en la población de estudio se muestran la Tabla 13.

Tabla 13. Estimación de la frecuencia de haplotipos.

Distribución de las frecuencias de los haplotipos (N=161)								
	snp396	snp399	snp407	Total	Casos	Controles	F*	Proteína
1	a	g	c	0.3681	0.4921	0.2457	0.3681	SAF
2	g	a	c	0.3309	0.385	0.4173	0.699	GTF
3	g	g	c	0.1163	0.0304	0.1293	0.8153	GAF
4	g	a	g	0.0963	0.0518	0	0.9116	GTL
5	a	a	c	0.0884	0.0632	0.1088	1	STF
6	g	g	g	0	0.0405	0.0211	1	GAL

*Frecuencia acumulada

8. DISCUSIÓN

Los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) involucrados en la fagocitosis de diferentes microorganismos por parte de los macrófagos (71).

Muchos reportes han mostrado que variantes genéticas en algunos PRRs como el TLR2 (72), TLR4 (25) y CD14 (57) están asociados con susceptibilidad a tuberculosis.

Así mismo, recientes estudios han reportado que uno de estos PRRs como es el receptor de manosa (CD206) juega un papel muy importante en la inmunidad innata y adaptativa.

El CD206 activa la respuesta inmune por el reconocimiento extracelular de carbohidratos que presentan en su estructura algunos microorganismos patógenos y pueden jugar un importante papel en la infección de Tb. Sin embargo polimorfismos en el gen *mrc1* que codifica para el receptor de manosa no han sido estudiados en México. Por lo tanto no se han reportado polimorfismos en este gen asociados con tuberculosis pulmonar en poblaciones mexicanas. En otros países del mundo se ha estudiado el gen *mrc1* y ha sido encontrado asociado a diferentes enfermedades como tuberculosis (79,80), lepra (5), asma (29) y sarcoidosis (30).

Nuestra hipótesis fue que los polimorfismos no sinónimos ubicados en el exón 7 del gen *mrc1* analizados en este estudio: 1188a/g, (G39S); 1197g/a, (T399A) y 1221c/g, (L407F) están asociados a tuberculosis pulmonar en una población del norte de México. El exón 7 codifica para el CTLD2 del CD206. El CTLD2 no está directamente involucrado en el

reconocimiento del ligando sin embargo éste ha sido implicado en el plegamiento del receptor. Polimorfismos de un solo nucleótido en este exón podrían por lo tanto afectar el reconocimiento de sus ligandos, aunque esto no ha sido plenamente demostrado.

En nuestra población el gen *mrc1* en la posición 396, 399 y 407 (exón 7) se observó polimórfico en contraste con una población china analizada por Zhang *et al.* (80) en el 2012 en el que analizó el gen *mrc1* en la posición 407 y no se encontró polimórfico. De la misma manera el gen *mrc1* en la posición 399 se analizó en una población vietnamita (5) y no se encontró polimórfico.

En nuestro estudio para el SNP G396S, el genotipo *g/g* fue más frecuentemente encontrado en el grupo de individuos control. Éste genotipo resultó asociado a tuberculosis pulmonar ($P= 0.0477$; OR= 0.4211; 95%CI 0.1759-1.0) con una posible función protectora. Mientras que en un estudio realizado por Zhang *et al.* (80) el alelo “g” en la población china que ellos analizaron también para el SNP G396S, fue encontrado más frecuente en el grupo de individuos sanos con una significancia de $P = 0.037$; OR = 0.76; 95% CI, 0.58-0.9. El valor de OR fue menor de 1 indicando que éste genotipo o alelo tiene efectos en el desarrollo de TB pulmonar y puede reducir el riesgo de padecer Tb pulmonar, es decir este genotipo tiene un efecto protector.

En el estudio realizado por Hattori *et al.*(29) en una población japonesa en el año 2009 el alelo “g” del SNP G396S fue encontrado asociado a asma con un efecto protector para el desarrollo de esta enfermedad ($P=0.011$, OR=0.61).

El SNP G396S del gen *mrc1* es un polimorfismo no sinónimo en el que se cambia el aminoácido glicina (Gly) por un residuo de serina (Ser). Una mutación en este sitio podría alterar la función del receptor de manosa afectando la unión de los polisacáridos de la pared de *Mycobacterium tuberculosis*, contribuyendo así a la modulación de la respuesta inmune que se monta ante la infección. La demostración del efecto de dicho polimorfismo en el reconocimiento de sus ligandos, y las consecuencias subsecuentes en su activación y modulación de la respuesta inmune requieren de mayores estudios.

Existe un solo reporte del análisis del SNP T399A (ubicado en el exón 7) en una población vietnamita encontrándose no polimórfico a diferencia de que en nuestra población se encontró polimórfico. En este SNP el genotipo a/a resultó asociado a Tb pulmonar con una posible función protectora ($P= 0.0400$; OR= 0.1063; 95% CI 0.005879-1.921).

En el análisis de la distribución de haplotipos en nuestra población el haplotipo agc/SAF se encontró más frecuente en el grupo de pacientes con Tb pulmonar por lo que puede indicar que está asociado a tuberculosis pulmonar como un factor de riesgo. Mientras que el haplotipo ggc/GAF se encontró frecuentemente en el grupo control lo que puede sugerir que este haplotipo podría estar asociado a tuberculosis pulmonar con un efecto protector. En un estudio realizado en China en donde también analizaron haplotipos del gen *mrc1* no encontraron asociación entre los haplotipos SAF, GTF y GAF con el desarrollo de Tb pulmonar (79). Por otra parte en un estudio en población brasileña en donde analizaron haplotipos del gen *mrc1* para observar su asociación con lepra encontraron que el haplotipo GAF se asoció a lepra multibacilar como un factor de riesgo [$P =0.004$ OR=1.61 (1.21-2.14)] mientras que el haplotipo SAF resultó asociado a lepra multibacilar

con una función protectora con una significancia de $P=0.004$ y un $OR=0.68$ (0.50-0.93). Se puede observar que a pesar de que la lepra y la tuberculosis son enfermedades causadas por micobacterias; nuestros resultados al ser comparados con otra población latina (brasileños) difieren en el análisis de haplotipos. Es decir mientras que en la población mexicana analizada en este estudio el haplotipo GAF se encontró asociado a Tb pulmonar con un efecto protector en la población brasileña éste haplotipo se asoció a lepra multibacilar como un factor de riesgo. Cabe mencionar que en este mismo estudio demostraron que el receptor de manosa, portador de los haplotipos SAF y GAF es incapaz de reconocer e internalizar *Mycobacterium leprae* por células HEK293 transfectadas con ambas versiones recombinantes del receptor (5).

9. CONCLUSIONES

1. Los 3 SNPs analizados en este estudio: G396S, T399A y L407F (ubicados en el exón 7 del gen *mrc1*) resultaron polimórficos en nuestra población.
2. El SNP L407F no se encontró asociado al desarrollo de tuberculosis pulmonar en nuestra población.
3. De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos 1188g y 1197a con el desarrollo de Tb pulmonar encontrándose un efecto protector.
4. De los tres haplotipos más frecuentes encontrados (SAF, GTF, GAF): el haplotipo agc/SAF se encontró más frecuente en el grupo de pacientes con Tb pulmonar por lo que puede indicar que está asociado a tuberculosis pulmonar como un factor de riesgo. Mientras que el haplotipo ggc/GAF se encontró mayoritariamente representado en el grupo control lo que puede sugerir que este haplotipo estaría asociado a tuberculosis pulmonar con un efecto protector.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders:2004.p.275–308.
2. Abel, L., El-Baghdadi, J., Bousfiha, A. A., Casanova, J.-L., & Schurr, E. (2014). Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369, 20130428. doi:10.1098/rstb.2013.0428
3. Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. *Regulation of murine macrophage effector function by lipoarabinomannana from mycobacterial strain with different degrees of virulence*. *Infect Immun* 1993;61:4173–4181.
4. Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17, 593–623. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593
5. Alter, A., De Léséleuc, L., Van Thuc, N., Thai, V. H., Huong, N. T., Ba, N. N., ... Schurr, E. (2010). Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Human Genetics*, 127(3), 337–348. doi:10.1007/s00439-009-0775-x
6. Anand, S. P., Selvaraj, P., Jawahar, M. S., Adhilakshmi, A. R., & Narayanan, P. R. (2007). Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*, 126, 135–138.

7. Antas, P. R. Z., Sales, J. S., Pereira, K. C., Oliveira, E. B., Cunha, K. S., Sarno, E. N., & Sampaio, E. P. (2004). Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 37, 1119–29. doi:/S0100-879X2004000800003
8. Anthony LS, Chatterjee D, Brennan PJ, Nano FE. *Lipoarabinomannana from Mycobacterium tuberculosis modulate the generation of reactive nitrogen intermediates by gamma interferon-activated macrophages*. FEMS Immunol Med Microbiol 1994;8:299–305.
9. Astarie-Dequeker, C., N'Diaye, E. N., Le Cabec, V., Rittig, M. G., Prandi, J., & Maridonneau-Parini, I. (1999). The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and Immunity*, 67, 469–477.
10. Azad, A. K., Sadee, W., & Schlesinger, L. S. (2012). Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infection and Immunity*, 80(10), 3343–59. doi:10.1128/IAI.00443-12

11. Blanchard DK, Michelini–Norris MB, Pearson CA, McMillen S, Djeu JY. *Production of granulocyte–macrophage colony–stimulating factor (GM–CSF) by monocytes and large granular lymphocytes stimulated with Mycobactrlum avium– M. intracellulare: activation of bactericidal activity by GM–CSF.* Infect Immun 1991;59:2396–2402.
12. Braunstein, M., Espinosa, B. J., Chan, J., Belisle, J. T., & Jacobs, W. R. (2003). SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*, 48, 453–464. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03438.x
13. Chaves, G. M., Diniz, M. G., da Silva-Rocha, W. P., de Souza, L. B. F. C., Gondim, L. a M., Ferreira, M. a F., ... Milan, E. P. (2013). Species Distribution and Virulence Factors of Candida spp. Isolated from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients in Brazil. *Mycopathologia*, 175(3-4), 255–263. doi:10.1007/s11046-013-9640-5
14. Claudio, M. S. A. N., Manuel, J., & Soto, S. Tuberculosis: mecanismos de defensa, inmunopatogénesis y biomarcadores de susceptibilidad y resistencia. (2008). *XI*(3), 279–284.
15. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537–544. doi:10.1038/31159

16. Correa, P. A., Gomez, L. M., Cadena, J., & Anaya, J. M. (2005). Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *Journal of Rheumatology*, *32*, 219–224. doi:10.1097/01.rhu.0000217151.45925.cf
17. Cywes, L., Hoppe, H. C., Daffé, M., & Ehlers, M. R. W. (1997). Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infection and Immunity*, *65*, 4258–4266.
18. Daffé, M., & Etienne, G. (1999). The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease*: *The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, *79*, 153–169. doi:10.1054/tuld.1998.0200
19. Dan, J. M., Kelly, R. M., Lee, C. K., & Levitz, S. M. (2008). Role of the mannose receptor in a murine model of Cryptococcus neoformans infection. *Infection and Immunity*, *76*, 2362–2367. doi:10.1128/IAI.00095-08
20. East, L., & Isacke, C. M. (2002). The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1572*, 364–386. doi:10.1016/S0304-4165(02)00319-7
21. Ehrt, S., Shiloh, M. U., Ruan, J., Choi, M., Gunzburg, S., Nathan, C., ... Riley, L. W. (1997). A novel antioxidant gene from Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*, 1885–1896. doi:10.1084/jem.186.11.1885
22. Ernst, J. D. (1998b). MINIREVIEW Macrophage Receptors for Mycobacterium tuberculosis, *66*(4), 1277–1281.

23. Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P., & Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *172*, 1785–1794. doi:10.1084/jem.172.6.1785
24. Ferwerda, B., Kibiki, G. S., Netea, M. G., Dolmans, W. M. V, & van der Ven, A. J. (2007). The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania. *AIDS (London, England)*, *21*, 1375–1377. doi:10.1097/QAD.0b013e32814e6b2d
25. Gazi, U., & Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, *214*(7), 554–61. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.004
26. Guenin-Macé, L., Siméone, R., & Demangel, C. (2009a). Lipids of pathogenic mycobacteria: Contributions to virulence and host immune suppression. *Transboundary and Emerging Diseases*, *56*(6-7), 255–268. doi:10.1111/j.1865-1682.2009.01072.x
27. Guirado, E., & Schlesinger, L. S. (2013). Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Frontiers in Immunology*, *4*(April), 98. doi:10.3389/fimmu.2013.00098

28. Hattori, T., Konno, S., Hizawa, N., Isada, A., Takahashi, A., Shimizu, K., ... Nishimura, M. (2009). Genetic variants in the mannose receptor gene (MRC1) are associated with asthma in two independent populations. *Immunogenetics*, *61*, 731–738. doi:10.1007/s00251-009-0403-x
29. Hattori, T., Konno, S., Takahashi, A., Isada, A., Shimizu, K., Shimizu, K., ... Nishimura, M. (2010). Genetic variants in mannose receptor gene (MRC1) confer susceptibility to increased risk of sarcoidosis. *BMC Medical Genetics*, *11*, 151. doi:10.1186/1471-2350-11-151
30. Hmama, Z., Gabathuler, R., Jefferies, W. A., de Jong, G., & Reiner, N. E. (1998). Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. 1950)*, *161*, 4882–4893.
31. Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, *19*(4), 333–341. doi:10.1157/13078029
32. Kahnert, A., Seiler, P., Stein, M., Bandermann, S., Hahnke, K., Mollenkopf, H., & Kaufmann, S. H. E. (2006). Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Immunology*, *36*(3), 631–647. doi:10.1002/eji.200535496

33. Kyei GB, Vergne I, Chua J, Roberts E, Harris J, Junutula JR, et al. Rab14 is critical for maintenance of Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. *EMBO J* 2006;25:5250-5259
34. Lazcano-ponce, E., & Salazar-martínez, E. (2001). Estudios epidemiológicos de casos y controles . *Fundamento teórico , variantes y aplicaciones*, 43(2), 135–150.
35. Lee, S. J., Zheng, N. Y., Clavijo, M., & Nussenzweig, M. C. (2003). Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infection and Immunity*, 71, 437–445. doi:10.1128/IAI.71.1.437-445.2003
36. Leteux, B. C., Chai, W., Loveless, R. W., Yuen, C., Uhlin-hansen, L., Combarous, Y., ... Feizi, T. (2000). The Cysteine-rich Domain of the Macrophage Mannose Receptor Is a Multispecific Lectin That Recognizes Chondroitin Sulfates A and B and Sulfated Oligosaccharides of Blood Group Lewis a and Lewis x Types in Addition to the Sulfated N -Glycans of Lutropin, 191(7).
37. Liu, Y., Chirino, A. J., Misulovin, Z., Leteux, C., Feizi, T., Nussenzweig, M. C., & Bjorkman, P. J. (2000). Crystal structure of the cysteine-rich domain of mannose receptor complexed with a sulfated carbohydrate ligand. *The Journal of Experimental Medicine*, 191, 1105–1116. doi:10.1084/jem.191.7.1105
38. Lyashchenko, K., Colangeli, R., Houde, M., Al Jahdali, H., Menzies, D., & Gennaro, M. L. (1998). Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infection and Immunity*, 66(8), 3936–3940.

39. Ma, X., Reich, R. A., Wright, J. A., Tooker, H. R., Teeter, L. D., Musser, J. M., & Graviss, E. A. (2003). Association between interleukin-8 gene alleles and human susceptibility to tuberculosis disease. *The Journal of Infectious Diseases*, *188*, 349–355. doi:10.1086/376559
40. Malik, S., Greenwood, C. M. T., Eguale, T., Kifle, A., Beyene, J., Habte, A., ... Schurr, E. (2006). Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia. *Human Genetics*, *118*, 752–759. doi:10.1007/s00439-005-0092-y
41. Martinez-Pomares, L., Reid, D. M., Brown, G. D., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Linehan, S. A., ... Wong, S. Y. C. (2003). Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol*, *73*, 604–613. doi:10.1189/jlb.0902450
42. McKenzie, E. J., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Lucas, a. D., Harris, J., Gordon, S., & Martinez-Pomares, L. (2007). Mannose Receptor Expression and Function Define a New Population of Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, *178*(8), 4975–4983. doi:10.4049/jimmunol.178.8.4975
43. McLaughlin, B., Chon, J. S., MacGurn, J. A., Carlsson, F., Cheng, T. L., Cox, J. S., & Brown, E. J. (2007). A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS Pathogens*, *3*, 1051–1061. doi:10.1371/journal.ppat.0030105

44. Morahan, G., Kaur, G., Singh, M., Rapthap, C. C., Kumar, N., Katoch, K., ... Huang, D. (2007). Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. In *Tissue Antigens* (Vol. 69, pp. 234–236). doi:10.1111/j.1399-0039.2006.773_3.x
45. Moreno-altamirano, A., C, M., López-moreno, S., & Corcho-berdugo, A. (2000). Principales medidas en epidemiología, 42(4).
46. Napper, C. E., Dyson, M. H., & Taylor, M. E. (2001). An Extended Conformation of the Macrophage Mannose Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 14759–14766. doi:10.1074/jbc.M100425200
47. Ng, V. H., Cox, J. S., Sousa, A. O., MacMicking, J. D., & McKinney, J. D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: Countering the phagocyte oxidative burst. *Molecular Microbiology*, 52, 1291–1302. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04078.x
48. Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., & Puzo, G. (2001). Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 166(12), 7477–7485.
49. O’Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. R. (2013). *The immune response in tuberculosis. Annual review of immunology* (Vol. 31, pp. 475–527). doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095939

50. Oh, J.-H., Yang, C.-S., Noh, Y.-K., Kweon, Y.-M., Jung, S.-S., Son, J. W., ... Song, C.-H. (2007). Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology (Carlton, Vic.)*, *12*, 594–598. doi:10.1111/j.1440-1843.2007.01108.x
51. Pathak, S. K., Basu, S., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Kundu, M., & Basu, J. (2005). Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates toll-like receptor-dependent interleukin-12 p40 production in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 42794–42800. doi:10.1074/jbc.M506471200
52. Pontow, S.E. et al. (1992) Mannose receptor. *Int. Rev. Cytol.* *137B*, 221–244.
53. Prigozy, T. I., Sieling, P. A., Clemens, D., Stewart, P. L., Behar, S. M., Porcelli, S. A., ... Kronenberg, M. (1997). The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity*, *6*, 187–197. doi:10.1016/S1074-7613(00)80425-2
54. Pulido, I., Leal, M., Genebat, M., Pacheco, Y. M., Sáez, M. E., & Soriano-Sarabia, N. (2010). The TLR4 ASP299GLY polymorphism is a risk factor for active tuberculosis in Caucasian HIV-infected patients. *Current HIV Research*, *8*, 253–258. doi:10.2174/157016210791111052

55. Rajaram, M. V. S., Brooks, M. N., Morris, J. D., Torrelles, J. B., Azad, A. K., & Schlesinger, L. S. (2010). Mycobacterium tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses. *The Journal of Immunology*, *185*(2), 929–942. doi:10.4049/jimmunol.1000866
56. Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. The Cellular Immune Response in Pulmonary Tuberculosis. *Invest Clin* 2005;46(4):391-412.
57. Rosas-Taraco, A. G., Revol, A., Salinas-Carmona, M. C., Rendon, A., Caballero-Olin, G., & Arce-Mendoza, A. Y. (2007). CD14 C(-159)T polymorphism is a risk factor for development of pulmonary tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, *196*, 1698–1706. doi:10.1086/522147
58. Russell, D. G. (2011). Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunological Reviews*. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x
59. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*, 389–400. doi:10.1084/jem.182.2.389
60. Schlesinger, L. S., Hull, S. R., & Kaufman, T. M. (1994). Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. 1950)*, *152*, 4070–4079.

61. Schreiber, S., Perkins, S. L., Teitelbaum, S. L., Chappel, J., Stahl, P. D., & Blum, J. S. (1993). Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN-gamma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. 1950)*, *151*, 4973–4981.
62. Schreiber, S., Perkins, S., Teitelbaum, S., Chappel, J., Stahl, P. D., & Blum, J. S. (2000). Regulation of Mouse Bone Marrow Macrophage Mannose Receptor Expression and Activation, *151*(9), 4973–4981.
63. Secretaría de Salud de México. Subsistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades. Septiembre 2014. p147.
64. Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *22*(15), 1928–9. doi:10.1093/bioinformatics/btl268
65. Stahl, P. D. (1992). The mannose receptor and other macrophage lectins. *Current Opinion in Immunology*. doi:10.1016/0952-7915(92)90123-V
66. Steinman, R. M. (2007). Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology*, *37*. doi:10.1002/eji.200737400
67. Stenger, S. (2005). Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *64 Suppl 4*, iv24–v28. doi:10.1136/ard.2005.042531
68. Sun J, Deghmane AE, Soualhine H, Hong T, Bucci C, Solodkin A, et al. Mycobacterium bovis BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. *J Leukoc Biol* 2007;*82*:1437-1445.

69. Tachado, S. D., Zhang, J., Zhu, J., Patel, N., Cushion, M., & Koziel, H. (2007). Pneumocystis-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*, 205–211. doi:10.1189/jlb.1005580
70. Takeda, K., Kaisho, T., & Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, *21*, 335–376. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126
71. Takeuchi, O.; Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*, 805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
72. Taylor, P. R., Gordon, S., & Martinez-Pomares, L. (2005). The mannose receptor: Linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends in Immunology*. doi:10.1016/j.it.2004.12.001
73. Thuong, N. T. T., Hawn, T. R., Thwaites, G. E., Chau, T. T. H., Lan, N. T. N., Quy, H. T., ... Dunstan, S. J. (2007). A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes and Immunity*, *8*, 422–428. doi:10.1038/sj.gene.6364405
74. Tso, H. W., Lau, Y. L., Tam, C. M., Wong, H. S., & Chiang, A. K. S. (2004). Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population. *The Journal of Infectious Diseases*, *190*, 913–919. doi:10.1086/422693
75. Vergne, I., & Daffé, M. (1998). Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Frontiers in Bioscience*: A Journal and Virtual Library, *3*, d865–d876.

76. Wang, D., Feng, J. Q., Li, Y. Y., Zhang, D. F., Li, X. A., Li, Q. W., & Yao, Y. G. (2012). Genetic variants of the MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Human Genetics*, *131*, 1251–1260. doi:10.1007/s00439-012-1153-7
77. WHO. (2013). *Global Tuberculosis Report 2013*. World Health Organization (p. 306). doi:10.3917/spub.092.0139.
78. Zhang, J., Zhang, J., Zhu, J., Zhu, J., Imrich, A., Imrich, A., Koziel, H. (2004). Pneumocystis Activates Human Alveolar Macrophage NF- κ B Signaling through Mannose Receptors. *Infection and Immunity*, *72*, 3147–3160. doi:10.1128/IAI.72.6.3147
79. Zhang, X., Jiang, F., Wei, L., Li, F., Liu, J., Wang, C., ... Li, J.-C. (2012). Polymorphic allele of human MRC1 confer protection against tuberculosis in a Chinese population. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(3), 375–82. doi:10.7150/ijbs.4047
80. Zhang, X., Li, X., Zhang, W., Wei, L., Jiang, T., Chen, Z., Li, J. C. (2013). The novel human MRC1 gene polymorphisms are associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Chinese Uygur and Kazak populations. *Molecular Biology Reports*, *40*, 5073–5083. doi:10.1007/s11033-013-2610-7

APENDICE A

Preparación de reactivos

Bromuro de etidio 0.5mg/ml (Stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 ml de agua ultrapura y aforar a 50ml. Almacenar a 4° C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar. Para preparar la solución de trabajo (2µg/ml) se efectua una dilución 1:250 de la solución stock (1 ml del stock+249 ml de agua ultrapura).

EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 500mM pH 8.0

Disolver 9.306g de NA₂ EDTA. H₂O en 40 ml de agua ultra pura, ajustar el Ph a 8.0 con lentejas de NAOH y aforar a 50ml. Esterilizar en autoclave.

Gel de agarosa al 0.8%

Disolver 0.4 g de agarosa grado biología molecular en 50 ml de TBE 1X, calentar hasta disolución total. Una vez que hayan cesado los vapores añadir 4µl de bromuro de etidio 2µg/mL mezclar y vaciar a la cámara de electroforesis.

Gel de agarosa al 1.5%

Disolver 0.75g de agarosa grado biología molecular en 50 ml de TBE 1X, calentar hasta disolución total. Una vez que hayan cesado los vapores añadir 4µl de bromuro de etidio 2µg/mL mezclar y vaciar a la cámara de electroforesis.

Gel de agarosa al 2.5%

Disolver 1.25g de agarosa grado biología molecular en 50 ml de TBE 1X, calentar hasta disolución total. Una vez que hayan cesado los vapores añadir 7µl de bromuro de etidio 2µg/mL mezclar y vaciar a la cámara de electroforesis.

Buffer de carga para elcetroforesis

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 ml de glicerol en TE 1X pH 8.0 y aforar a 10 ml. No esterilizar.

Solución salina al 0.85%

Disolver 0.85g de NaCl en 100 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 10X (Stock)

Disolver 54 g de Tris-base y 27.5g de ácido bórico en 20 ml de EDTA 500mM y en agua ultrapura, aforar a 500 ml. Esterilizar en autoclave. Para preparar la solución de trabajo 1X se mezclan 100 ml de agua destilada estéril y se afora a 1 L.

TE (Tris-EDTA) 1X pH 8.0

Mezclar 500 µl de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 y 50 µl de EDTA 500mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25ml. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl 500 mM pH 8

Disolver 30.3 g de Tris base en 300 ml de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con HCl concentrado y aforar a 500 ml.

Folio (MICROBIOLOGÍA):					
GRUPO:	CONTROL	TB	TB/DIABETES	TB/VIH	Clave de Proyecto MB13-001

A) DATOS DE IDENTIFICACIÓN.

1. Nombre: _____ Apellidos: _____
2. Dirección: _____ Municipio: _____
3. Tiempo de residir en el municipio actual (años): _____
4. Lugar de Nacimiento (Municipio/Estado): _____
5. ¿A vivido por más de 1 año en otro estado? _____ ¿Cual? _____
6. ¿Podemos contactarlo(a) si es necesario? SI / NO Tel: _____
- Cel: _____ E-mail: _____

B) DATOS PERSONALES

7. ¿Cuál es su fecha de nacimiento? _____ ¿Cuántos años tiene?: _____
8. Sexo: 1) Femenino 2) Masculino

C) ANTECEDENTES PERSONALES Y HABITOS GENERALES

9. ¿Cuál es su ocupación Actual?:
1) Desempleado 2) Empleado dependiente 3) Empleado independiente 4) Jubilado/Retirado
5) Estudiante
10. ¿La casa en la que Usted vive es?
1) Propia 2) Rentada 3) Prestada 4) Otra _____
11. ¿Conoce o ha escuchado hablar del VIH/SIDA? SI / NO
12. ¿La padece usted? 1) Si 2) No 3) No sabe
(En caso de respuesta afirmativa) Fecha de diagnóstico: _____
¿Recibió profilaxis con Isoniazida? SI / NO ¿Hace cuánto? _____
13. ¿Es usted diabético? 1) Si 2) No 3) No sabe
14. ¿Padece usted alguna otra enfermedad pulmonar distinta a TB? SI / NO ¿Cuál? _____

D) ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

15. ¿Alguien de su familia ha padecido tuberculosis? SI / NO ¿Cuál es su parentesco?:
1) Padre 2) Madre 3) Abuelos Paternos 4) Abuelos Maternos
5) Hermanos 6) Hijos 7) Esposo(a) 8) Otros _____

16. ¿Convive con este familiar? SI / NO ¿Cuántos días a la semana convive usted con él?

1) Ocasionalmente 2) 1-2 días 3) 3 días 4) más de 3 días

17. ¿Tiene algún familiar diabético? SI / NO ¿Cuál es su parentesco?:

1) Padre 2) Madre 3) Abuelos Paternos 4) Abuelos Maternos
5) Hermanos 6) Hijos 7) Esposo(a) 8) Otros _____

E) ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS

18. ¿Es la primera vez que le diagnostican tuberculosis? SI / NO

19. Si tuvo tuberculosis previamente. ¿Hace cuánto tiempo presentó TB? _____

20. ¿Se ha hecho la prueba de la tuberculina (PPD)? SI / NO ¿Cuál fue su resultado del PPD? _____

21. ¿Se le hizo radiografía de Tórax? SI / NO ¿Cuál fue la interpretación médica? _____

22. ¿Recibió tratamiento farmacéutico para la Tuberculosis? 1) Si 2) No 3) Aun lo toma
¿Cuánto tiempo tiene con el tratamiento? _____ Fecha en que inició el tratamiento: _____

23. ¿Siguió alguna campaña del T.A.E.S.? SI / NO

24. ¿Termino el esquema de tratamiento T.A.E.S.? SI / NO

25. ¿Hace cuánto tiempo termino el tratamiento? _____ Fecha de fin de tratamiento: _____

F) DATOS CLÍNICOS

26. ¿Tiempo de presentar síntomas? ___ años ___ meses. Fecha de inicio de síntomas: _____

27. Estudios previos:

() PPD Fecha: _____ Lugar: _____ Resultado: _____

() Rd Torax Fecha: _____ Lugar: _____ Resultado: _____

() BAAR Fecha: _____ Lugar: _____ Resultado: _____

OBSERVACIONES:

Nombre y firma de quien aplicó la encuesta: _____

Lugar y fecha en donde se realizó la encuesta: _____

Los datos personales recabados serán protegidos y tratados con carácter de confidencialidad. Así mismo, hacemos de su conocimiento que los estudios y análisis que se lleven a cabo con el material biológico que proporcione tienen fundamento en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud; Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2012, para la prevención y el control de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, y la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, para la vigilancia epidemiológica. Los productos biológicos que Usted proporcione quedarán a resguardo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias (CIPTIR) del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Los proyectos de investigación en los que se use el material biológico que Usted proporcione cuentan con la aprobación de la Comisión de bioética de la Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Proyecto Clave MB13-001). El responsable del resguardo y buen uso de sus Datos Personales en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina es el Dr. José Prisco Palma Nicolás, y la dirección a donde el interesado podrá ejercer los derechos de Acceso, Rectificación, Cancelación y Oposición a su uso ante la misma es en Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

Polimorfismo en los receptores CD206 y CD209 y su efecto sobre el perfil de activación Th1/Th2 in vitro en pacientes con tuberculosis pulmonar

Usted ha sido invitado (a) a participar en este estudio de investigación. Este documento tiene toda la información sobre este estudio. Tómese el tiempo necesario para que lo lea y haga cualquier pregunta que pudiera tener a su médico o personal del estudio de investigación.

2.- LOS INVESTIGADORES

Investigador Principal: Dr. C. José Prisco Palma Nicolás

Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, CP. 64460 Monterrey NL, México. Tel: (81) 8329-4177. Ext. 2568.

Colaboradores:

Dra. C. Gloria M. González González. Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, CP. 64460 Monterrey NL, México. Tel: (81) 8329-4177.

Dr. Med. Luis Adrián Rendón. Servicio de Neumología, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Av. Francisco I. Madero y Dr. José Eleuterio González, Col. Mitras Centro, CP. 64460 Monterrey NL, México. Tel: (81) 8346-6216.

3.- ACERCA DE ESTE ESTUDIO.

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad que ocasiona un gran número de muertes en todo el mundo. En México se registran unos 15,000 casos nuevos de tuberculosis pulmonar cada año, ya que la vacunación no es 100% efectiva.

4.- ¿PARA QUE SE LLEVA A CABO ESTE ESTUDIO?

Título abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Sello y firma del Comité de Investigación.

COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN





El propósito de este estudio es evaluar algunas características genéticas de los individuos aquejados de tuberculosis. Los datos de esta investigación serán utilizados para determinar si hay factores genéticos que contribuyan a padecer la enfermedad.

5.- ¿CUÁLES SON LOS REQUISITOS PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

En este estudio participan pacientes que hayan sido diagnosticados con tuberculosis pulmonar, incluso si ya están en fase de tratamiento, o si ya lo concluyeron. Los pacientes participantes pueden ser hombres o mujeres de cualquier edad. También se incluye a un grupo de personas sanas como grupo de control.

6.- ¿QUÉ SE ME PEDIRÁ QUE HAGA?

Si usted se ofrece como voluntario para participar en este estudio, se le pedirá que proporcione una muestra de sangre, la cual le será tomada de la vena del antebrazo. También se le pedirá que conteste una encuesta, la cual contendrá datos personales, demográficos y socioeconómicos, los cuales serán tratados de manera confidencial.

Su participación tendrá una duración aproximada de 30 minutos considerando la toma de muestra de sangre y la aplicación del cuestionario, y solamente se le pedirá su colaboración por una única ocasión.

7.- ¿QUÉ ME PODRÍA PASAR POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

La toma de muestra de sangre venosa la llevará a cabo personal capacitado, por lo que no hay riesgos previsible asociados con su participación. Su participación tampoco implicará ningún costo adicional por los estudios que vayan a realizarse. Usted tiene el derecho de decidir no participar en este estudio sin que ésta decisión tenga consecuencias en el diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

8.- ¿QUIÉN PAGARÍA LAS CUENTAS DEL HOSPITAL O DEL MÉDICO EN CASO DE QUE ME PASE ALGO?

Es poco probable que su participación en el proyecto de como resultado un daño a su salud o tenga efecto alguno en su diagnóstico o tratamiento. Si existiera una lesión secundaria Usted deberá notificar al Investigador Principal para que reciba la atención médica necesaria en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Los gastos que pudieran derivarse de los procedimientos aplicados para el uso de éste proyecto correrán a cargo del presupuesto asignado para su realización.

9.- ¿QUÉ BENEFICIOS TENGO POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Titulo abreviado del Protocolo
Forma de Consentimiento de Investigación
Colocar Fecha y versión del mismo
Iniciales del Participante: _____

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



Sello y firma del Comité de Aprobación.

**COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**



No existen beneficios inmediatos que pudieran favorecer el curso de la tuberculosis en los pacientes que participen en el estudio. Sin embargo, se espera que a largo plazo el conocimiento generado durante el proyecto pueda emplearse en beneficio de otros pacientes.

10.-¿QUÉ OTRAS OPCIONES DE TRATAMIENTO TENGO EN CASO DE NO ACEPTAR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Su participación en este estudio no implica cambio alguno en su esquema de tratamiento.

11.- ¿CÓMO PROTEGERÁ MI PRIVACIDAD?

Su nombre estará ligado a un código y solo permanecerá en la encuesta que se le aplique, en adelante su muestra será manejada solamente con el código para mantener la confidencialidad.

12.- ¿TENDRE ALGO QUE PAGAR DURANTE LA INVESTIGACIÓN?

Usted no deberá de pagar por ningún procedimiento, estudio o medicamento relacionado en el proyecto al que se le invita a participar. Dichos gastos correrán a cargo del presupuesto asignado al proyecto.

13.- ¿RECIBIRÉ ALGUN PAGO O INCENTIVO POR MI PARTICIPACIÓN?

No se ofrecen incentivos o compensación económica alguna para los participantes.

14.- ¿QUÉ VA A PASAR SI ME ARREPIENTO DE PARTICIPAR?

Su participación en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para retirarse del estudio por favor contacte directamente al responsable del Proyecto (Dr. José Prisco Palma Nicolás) en: Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, CP. 64460 Monterrey NL, México. Tel: (81) 8329-4177. Ext. 2568.

15.- SI TENGO PREGUNTAS, ¿A QUIEN PUEDO LLAMAR O COMUNICARME?

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor hable con el Responsable del Proyecto, Dr. José Prisco Palma Nicolás: Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, CP. 64460 Monterrey NL, México. Tel: (81) 8329-4177. Ext. 2568.

Titulo abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo

Iniciales del Participante: _____

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Sello y firma del Comité de Investigación.
COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN





Fecha

Firma del Segundo Testigo

Nombre en letra de molde

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección

II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

Fecha

Firma de la Persona que Obtuvo el
Consentimiento/Investigador Principal

Nombre en letra de molde

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Titulo abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo

Iniciales del Participante: _____

