



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del transcriptoma en células de sangre
periférica de individuos con tuberculosis latente
durante el tratamiento con isoniazida utilizando la
técnica de microarreglos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANTONIETA ESPEJEL GRAGEDA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARTHA TORRES ROJAS

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice

RESUMEN	2
LISTA DE ABREVIATURAS	2
ANTECEDENTES	3
INTRODUCCIÓN	3
Historia de la tuberculosis	3
Epidemiología	4
Infección	5
Diagnóstico y Tratamiento	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS GENERALES	7
OBJETIVOS PARTICULARES	8
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Población de estudio	8
Extracción de RNA	9
Procesamiento de Microarreglos	13
Análisis de datos	23
RESULTADOS	24
Población estudiada	24
Análisis de datos obtenidos por microarreglos	25
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	37
REFERENCIAS	37

Resumen

La tuberculosis representa la segunda causa de muertes por enfermedades infecciosas. Además, un tercio de la población mundial tiene tuberculosis latente, aunque estos individuos tienen de un 5 a 10% de riesgo de reactivación, representan el mayor reservorio de la enfermedad. A pesar de ser una enfermedad prevenible y tratable, sigue representando un problema de salud pública debido a que aún no existe un método diagnóstico eficiente y altamente específico. Por otra parte, la administración de tratamiento profiláctico es largo y debe ser supervisada debido a sus fuertes efectos secundarios. Actualmente, en el caso de la tuberculosis latente, no se ha determinado un método que permita dar seguimiento a los pacientes durante el tratamiento profiláctico con isoniazida. Por todas estas razones se considera relevante estudiar los perfiles de expresión génica de individuos con tuberculosis latente, esto con el fin de identificar patrones que permitan diferenciar entre diferentes pruebas diagnósticas y además dar seguimiento al tratamiento. Este trabajo se enfocó en estudiar por el método de microarreglos, la expresión genética de 6 voluntarios pertenecientes a diferentes grupos diagnósticos, a lo largo de 6 meses de tratamiento. Con base en los cambios de expresión génica obtenidos y en estudios bibliográficos se discutieron algunos genes cuyas funciones podrían estar relacionadas con la respuesta inmune hacia tuberculosis o a la ingesta de isoniazida.

Lista de abreviaturas

ESAT-6: *Early Secretory Antigenic Target Protein 6*

CFP10: *Culture Filtrate Protein 10*

IFN- γ : Interferon gamma

IGRAs: (*Interferon Gamma Release Assay*) Ensayo de Liberación de Interferon Gamma

INH: Isoniazida

LTB: Tuberculosis Latente

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PPD: (*Purified Protein Derivative*) Derivado de Proteínas Purificadas

TB: Tuberculosis

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TST: (*Tuberculin Skin Test*) Prueba Intradérmica de la Tuberculina

T0: Tiempo 0 (Antes de iniciar el tratamiento con isoniazida)

T1: Tiempo 1 (Después de 1 mes de iniciar el tratamiento con isoniazida)

T6: Tiempo 6 (Después de 6 meses de tratamiento con isoniazida)

Antecedentes

El tratamiento profiláctico con isoniazida (INH) en individuos con tuberculosis latente (LTB) es importante, pues estos representan el mayor reservorio de la *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, dicho tratamiento presenta fuertes efectos secundarios, y debido a su larga duración ha mostrado problemas de adherencia por parte de los pacientes, lo cual a largo plazo, puede generar cepas farmacorresistentes. Por estas razones es importante diagnosticar correctamente a los individuos y darles seguimiento a lo largo del tratamiento y para poder hacerlo es indispensable encontrar biomarcadores que permitan determinar el estado patológico del paciente y medir la eficiencia del tratamiento. Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios sobre los tratamientos y su eficiencia en casos de la tuberculosis activa pero muy pocos en casos LTB, principalmente como ya se mencionó antes, debido a la carencia de biomarcadores. La falta de este tipo de moléculas, se debe en parte a que dentro de los estudios que se han enfocado a LTB y su tratamiento, se observan discordancias que no permiten llegar a una conclusión ni determinar moléculas útiles para el seguimiento. Estas discordancias pueden deberse a múltiples factores que van desde realizar un diagnóstico adecuado evitando falsos positivos y reacciones cruzadas, hasta diferencias en las poblaciones estudiadas y regímenes de tratamiento. Incluso, de acuerdo con algunos investigadores, ninguno de los métodos descritos anteriormente, permiten diferenciar con precisión entre individuos con LTB e individuos sanos, pues dichos métodos se enfocan en medir la inmunidad hacia la infección y no la enfermedad. Esto representa un problema, especialmente en las regiones con alta incidencia de tuberculosis (TB) (Maertzdorf *et al.*, 2012).

Aunque existen varios programas de tratamiento tanto para pacientes con TB como para individuos LTB, cada vez es más evidente que lo que realmente se requiere es una técnica efectiva para el diagnóstico de ésta enfermedad. Actualmente, se siguen usando técnicas diagnósticas de más de un siglo de antigüedad y este es el punto más débil en la lucha contra la TB. Por eso, las investigaciones más recientes, se han enfocado en la identificación de biomarcadores que permitan diferenciar entre individuos sanos, individuos infectados e individuos enfermos de TB (Doherty *et al.*, 2009).

Introducción

Historia de la tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa que se ha presentado bajo forma de epidemias con periodos de alta actividad y otros de recesión, sin embargo jamás ha logrado eliminarse por lo que se considera que es el patógeno microbiano que ha matado al mayor número de individuos.

La TB es una enfermedad que ha afectado a los humanos desde tiempos prehistóricos. Los estudios enfocados en la micobacteria estiman que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de

años. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) proviene de un progenitor que se originó hace 3 millones de años en el este de África y que infectó algunos homínidos. Aunque los casos de tuberculosis ocurrieron desde la antigüedad y la enfermedad era bien conocida por civilizaciones como la griega, el primero en emitir conceptos claros sobre la tuberculosis fue Laennec en 1802. Él, estudió y comprendió la patogénesis y describió la mayoría de los síntomas de la enfermedad pulmonar; también fue quién determinó que había casos pulmonares y extra pulmonares, sin embargo, aún faltaban muchas cosas por comprender acerca de ésta enfermedad. Fue a partir de los estudios y postulados de Koch y Heinrich cuando se esclarecieron múltiples aspectos de la TB. Koch identificó al bacilo causante de la tuberculosis y presentó sus postulados sobre la enfermedad que actualmente siguen siendo válidos y que le valieron el Premio Nobel en 1905. A Koch, también se le atribuye el descubrimiento de la tuberculina en 1890, y del estado de latencia, término definido por el mismo para identificar a los individuos infectados con el tubérculo pero sin presentar síntomas patológicos (Daniel, 2006).

Epidemiología

La TB se considera de gran importancia debido a que está presente en todas las regiones del mundo. De acuerdo con el Reporte Global de TB del 2014 publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis está presente en 202 países. La TB es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas después del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y es por eso que en 1993 fue declarada como una emergencia de salud pública a nivel mundial. Desde entonces, la mortalidad por TB ha bajado en un 45% sin embargo, actualmente se sigue considerando uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, razón por la que la OMS inició el proyecto “ Stop TB strategy”. Dicho proyecto, tuvo por objetivo reducir de manera global los casos de TB en el año 2015 (World Health Organization, 2014).

De acuerdo con el reporte publicado por la OMS en el 2014, aproximadamente 9.0 millones de personas desarrollaron TB y 1.5 millones murieron por esta causa. De estas últimas, 360 000 eran VIH positivas. Los casos de TB multi-fármaco resistente se han mantenido iguales desde el 2013 y corresponden a un 3.5% del total de casos. Aunque los casos de TB han ido disminuyendo a lo largo de los años, se considera que al ser una enfermedad prevenible y tratable, la tasa de decesos sigue siendo muy alta (World Health Organization, 2014).

La TB no tiene la misma incidencia en los diferentes géneros ni en las diferentes regiones del mundo. Se ha observado mayormente en hombres (60% de los casos totales). En el 2013, de los 9 millones de casos de TB que se desarrollaron en el mundo, la distribución fue la siguiente: más de la mitad (56%) ocurrieron en el Sureste de Asia y en regiones del Oeste pacífico. En cuanto al continente Africano, se reportan 25% de los casos totales, pero es la región con mayor tasa de incidencia y muertes respecto a la población total. Por otra

parte, es importante tomar en cuenta las enfermedades asociadas a TB y como éstas afectan las tasas de prevalencia, infección y muerte. El 18% de los casos restantes se encuentran en el continente Americano y en Europa. En el caso del VIH, en 2013, de los 9 millones de individuos que padecían TB, aproximadamente 13% eran VIH positivos, y la mayoría de individuos con TB asociada a VIH se encontraron en el continente africano en dónde 4 de cada 5 individuos con VIH también padecen TB (World Health Organization, 2014).

En México, la incidencia de TB en el año 2013 fue de 25000 casos, esto es un 53% más que el número de casos incidentes en los demás países de la región de América Central. En general, los casos de TB han ido disminuyendo en los países del continente Americano, excepto en México en dónde la tasa de incidencia se ha mantenido igual desde hace 6 años (Pan American Health Organization, 2014)

Se estima que entre 2000 y 2013, han habido tratamientos exitosos en 37 millones de personas y la tuberculosis en el mundo ha disminuido a una tasa aproximada de 1.5% al año. Durante este mismo periodo, la mortalidad disminuyó en un 45% y la prevalencia en un 41%, todo esto gracias a los diagnósticos y los tratamientos, sin embargo, aún se requieren más esfuerzos para poder alcanzar las metas establecidas en el “Millenium Development Goals” (MDG). El MDG busca detener e incluso revertir la incidencia de TB en el mundo enfocándose en la incidencia, la prevalencia y la mortalidad. El objetivo en el 2015 es reducir la tasa de incidencia 50% (World Health Organization, 2014).

Con el fin del año 2015, se empieza una época de transición en la cual se esperan haber cumplido las metas pospuestas para poder iniciar con otras nuevas. El nuevo proyecto, “The End TB Strategy”, plantea terminar con la epidemia global de TB en 2035, al reducir los porcentajes de muerte por causa de TB en un 95% y la incidencia de TB en un 90%. Además se espera que las familias afectadas por la TB ya no se tengan que enfrentar a costos desmesurados por diagnóstico y tratamiento (World Health Organization, 2014).

Infección

MTB, el agente biológico de la tuberculosis, puede infectar cualquier tejido, sin embargo, la vía principal de entrada del bacilo al hospedero es la respiratoria y por lo tanto el órgano más afectado es el pulmón. La tuberculosis extra pulmonar solo se desarrolla en 10% de los casos. Aproximadamente sólo el 10% de los infectados desarrolla la enfermedad y ésta es fatal en el 50% de los casos (Kaufmann, 2001).

En el caso de la tuberculosis pulmonar, los macrófagos alveolares son capaces de fagocitar los bacilos pero no logran eliminar al patógeno por completo y permanece un pequeño número de bacilos en el hospedero. Las células T específicas son estimuladas en los nodos linfáticos e inducen la contención de las bacterias en pequeños granulomas que se forman en el pulmón. Así se desarrolla un equilibrio dinámico entre la

persistencia de la bacteria y la defensa del hospedero. Este equilibrio puede durar toda la vida y el individuo no desarrolla la enfermedad, la infección permanece en un estado que se conoce como de latencia (Kaufmann 2001).

Amberson describió la latencia como la presencia de lesiones tuberculosas de cualquier tipo pero sin producir síntomas. La mayoría de los individuos, logran desarrollar una respuesta inmune fuerte al entrar en contacto con MTB, y dicha respuesta detiene el progreso de la infección, de tal forma que solo hay daños locales, generalmente en el parénquima del pulmón y en los nodos linfáticos y no se desarrolla la enfermedad. Sin embargo, el sistema inmune no es capaz de eliminar al patógeno, o es un progreso excesivamente largo en el que el individuo permanece en estado de latencia con riesgo de reactivación (Gomez and McKinney, 2004).

Por otra parte, Mack describe la latencia, como un estado en el que existe la persistencia de una respuesta inmune de memoria por parte de las células T hacia la micobacteria sin embargo, no hay evidencia clínica, pues no hay síntomas ni enfermedad en el individuo. Además, Mack propone una explicación biológica y es que dentro del granuloma, existe un equilibrio entre las micobacterias que se dividen de manera activa y las micobacterias que se adaptan al estrés generado por los macrófagos que no son capaces de eliminar a MTB pero si de reducir su actividad y crecimiento metabólico. Se considera entonces que MTB entra en una fase de no replicación en la parte necrótica de la lesión, sin embargo, no se conoce con certeza el estado metabólico en el que se encuentra. Lo que sí se sabe es que ocurre una sobre regulación de los genes encargados de la hidrólisis de ácidos grasos para la obtención de energía. En este estado, las micobacterias no causan síntomas aparentes ni enfermedad y esto es lo que diferencia el estado latente del estado activo. Las micobacterias se mantienen y son viables para salir de su estado de latencia y entonces potencialmente pueden causar enfermedad (Mack *et al.*, 2009).

De acuerdo con la OMS, la infección LTB se define como una respuesta inmune persistente hacia los antígenos de MTB por parte del individuo infectado sin que haya ninguna manifestación clínica de tuberculosis activa. Las personas con LTB no son fuente de infección, pero corren el riesgo de desarrollar la enfermedad y por lo tanto ser fuente de contagio. No obstante, la tasa de reactivación de TB en individuos LTB es muy baja, corresponde al 5-10% y en general esto ocurre durante los primeros 5 años consecutivos a la infección. El riesgo de reactivación depende de varios factores, pero el más importante es el que está ligado al estado en el que se encuentra el sistema inmune del hospedero (World Health Organization, 2015).

Actualmente existen tratamientos como la isoniazida, la rifampicina, el etambutol, la pirazinamida y la estreptomycin que previenen el riesgo de reactivación y tienen alta eficacia (60 a 90%). Debido a los fuertes efectos secundarios dentro de los que se incluyen daño hepático y sordera entre otros, es importante

valorar con precisión a quién se le debe de administrar y en qué casos los resultados post-tratamiento serán más beneficiosos que los efectos secundarios provocados. Por lo tanto, es importante tener pruebas diagnósticas precisas y efectivas, sin embargo, aún no se cuenta con una prueba 100% efectiva (llamada prueba de oro) y debido a esto y a los riesgos y costos, no es posible dar tratamiento a la totalidad de la población. Para poder tener control sobre la TB y erradicarla en el 2035 como lo plantean las metas de la OMS “Stop TB”, es necesario desarrollar una prueba diagnóstica, identificar a los individuos que podrían estar en riesgo y diagnosticarlos adecuadamente, proporcionar tratamiento asegurándose de que será completado y por último evaluar este proceso de manera continua. La OMS recomienda procedimientos para poder identificar a las poblaciones en riesgo y administrarles tratamiento. El tipo de procedimiento a seguir varía según la situación social y económica del país (World Health Organization, 2015).

Diagnóstico y Tratamiento

La OMS sugiere ciertos lineamientos en cuanto a la detección de personas en riesgo y el diagnóstico de TB. En países que cuentan con ingresos económicos medios o elevados y en dónde la incidencia de TB es menor a 100 casos por 100 000 personas entonces se recomienda fuertemente que se realicen pruebas diagnósticas de liberación de interferón gamma (IGRAS) o la prueba intradérmica a la tuberculina (TST) en los siguientes casos: a todas las personas con VIH, a los pacientes bajo tratamiento supresor de Factor de Necrosis Tumoral alfa ($TNF-\alpha$), a niños y adultos en contacto con pacientes de TB pulmonar, pacientes sometidos a diálisis, pacientes que van a recibir un trasplante hematológico y pacientes con silicosis (World Health Organization, 2015).

Por otra parte, existen recomendaciones condicionales para los casos en los que se deben realizar diagnósticos por IGRAS o TST, estos casos son los siguientes: inmigrantes provenientes de países con alta incidencia de TB, vagabundos, consumidores de drogas ilícitas, presos y trabajadores del sector salud (World Health Organization, 2015).

En cuanto a los países de recursos económicos bajos, se recomienda que todas las personas con VIH y los niños mayores de 5 años que tienen contacto directo con enfermos de TB, después de haber sido evaluados y comprobar que no tengan TB, pero si LTB, deben ser tratados. A continuación se explican las diferentes pruebas diagnósticas recomendadas en cada caso así como de los regímenes de tratamiento (World Health Organization, 2015).

Tuberculosis activa

Para el diagnóstico de TB, la OMS establece que es crítico tener una confirmación bacteriológica por baciloscopía de expectoración, es decir poder detectar por observación microscópica, la presencia de micobacterias en el esputo para poder asegurar que los individuos fueron diagnosticados correctamente y si sufren de TB puedan recibir el tratamiento pertinente. Durante años, ésta prueba ha sido la más utilizada.

Consiste en obtener esputo del individuo que se quiere diagnosticar, realizar la tinción para Bacilos ácido-alcohol resistentes y observar al microscopio para determinar si hay presencia de bacilos de la micobacteria o no. Este método diagnóstico es muy barato y fácil de hacer incluso aunque no se cuente con un laboratorio altamente especializado, sin embargo, es una prueba poco sensible, especialmente en casos de pacientes con VIH o niños. Por otra parte, tampoco es específica, pues no permite detectar entre MTB y otros tipos de micobacterias (por ejemplo, *M. bovis* o *M. leprae* entre otras) o micobacterias saprófitas. Una alternativa a esta prueba, es la de los cultivos bacteriológicos, el inconveniente de éstos es que requieren personal capacitado, un laboratorio con las condiciones de bioseguridad necesarias además de que los costos son más elevados y el tiempo para obtener el resultado es muy largo, de 21 días (World Health Organization, 2014).

Debido a los inconvenientes mencionados previamente sobre algunas de las pruebas diagnósticas para TB activa, desde el 2010, la OMS recomienda el uso de la prueba Xpert MTB/RIF como diagnóstico inicial de individuos susceptibles de padecer tuberculosis multi-fármaco-resistente o asociada a VIH. Desde el 2013, tras un estudio sobre la especificidad, sensibilidad y los costos de esta prueba, se recomienda que éste sea el método inicial de diagnóstico para todos los individuos susceptibles de padecer TB pulmonar y en algunos casos también recomiendan esta prueba para diagnosticar casos de TB extra pulmonar. Una de las grandes ventajas de esta prueba, es que permite identificar a los individuos con TB fármaco-resistente a (World Health Organization, 2014). El problema es que, en la mayoría de los casos, los individuos no son sometidos a ninguna otra prueba diagnóstica de confirmación. A lo largo del 2013, se reportaron de manera global, 4.9 millones de casos incidentes de tuberculosis pulmonar. De estos, solo el 58% fueron sometidos a alguna otra prueba recomendada por la OMS (Xpert MTB/RIF u otra). Esto quiere decir que dentro de los 42% restantes, algunos individuos pudieron haber sido falsos positivos a pruebas poco específicas o falsos negativos a pruebas poco sensibles y por lo tanto pudieron haber sido sometidos a tratamientos que implican efectos secundarios (World Health Organization, 2014).

Para el tratamiento de la tuberculosis activa se recomienda el uso de 3 y 4 fármacos para evitar la fármaco resistencia. El tratamiento con INH es el régimen terapéutico mejor estudiado. Desde 1950 la INH es el fármaco mas usado en el tratamiento de la TB latente. La actividad microbicida de la INH sobre MTB se ha demostrado en cultivos in vitro, en modelos de tuberculosis en animales y en individuos con tuberculosis activa [11]. Por otro lado, se ha descrito que la actividad bactericida de la INH es reducida sobre el bacilo en la fase latente y esto se puede explicar por su mecanismo de acción. La INH es una prodroga que se activa por la enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *KatG* de MTB. En su forma activa la INH inhibe la síntesis de ácidos micólicos (importantes por formar parte de la pared celular hidrofóbica de MTB) mediante su unión con el NADPH-y la proteína acarreadora enoyl acil reductasa (*inhA*) que es esencial para la elongación de los ácidos micólicos [12]. A pesar de su limitada acción en la TB latente, en la actualidad

la INH es el único fármaco que ha demostrado ser efectivo y es reconocido como el agente quimioprolifáctico estándar para la infección tuberculosa. Los lineamientos de la OMS y la Norma Oficial Mexicana señalan que deben recibir tratamiento los niños menores de 5 años, los menores de 14 años que no hubieran sido vacunados con BCG y que han estado expuestos en el mismo domicilio a pacientes con TB y los sujetos infectados por VIH .

De acuerdo con la norma mexicana, los fármacos para tratar la tuberculosis son los que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1: Medicamentos propuestos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993) para tratar la tuberculosis

Medicamento	mg/KG de peso
Isoniazida	5-10 mg
Rifampicina	10-20 mg
Pirazinamida (a)	20-30 mg
Etreptomicina (b,c)	15-20 mg
Etambutol (d)	dosis no indicada

a: Enfermos de menos de 50 kg. de peso, 1.5 gr. por día.

b: Enfermos mayores de 50 años, mitad de la dosis.

c: No utilizarlo durante el embarazo.

e: No usarlo en niños.¹

¹ Tabla modificada de Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993) para tratar la tuberculosis (Secretaría de Salud, 2008)

El régimen propuesto por la Norma oficial Mexicana para tratar a lo enfermos con tuberculosis activa se basa en un régimen primario y en uno de sostén, se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2: Régimen propuesto por la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993) para tratar la tuberculosis

MedicamentoFase	mg/KG de peso
Intensiva	(dosis diarias de lunes a sábado hasta completar 60 dosis)
Isoniazida	5-10 mg
Rifampicina	10-20 mg
Pirazinamida	20-30 mg
Medicamento Fase de Sostén	mg/KG de peso (dos veces por semana hasta completar 30 dosis)
Isoniazida	800 mg
Rifampicina	600 mg

Tuberculosis latente

- Pruebas *in-vivo* o de hipersensibilidad

La prueba intradérmica a la tuberculina (TST) o prueba de Mantoux, es la principal herramienta de diagnóstico para LTB. Es una de las pruebas diagnósticas de mayor antigüedad (aproximadamente 100 años) que sigue usándose en medicina clínica. Dicha prueba, se basa en la respuesta inmune de un organismo hacia el PPD. La prueba consiste en inyectar de manera intradérmica el PPD y esperar una reacción de hipersensibilidad tardía por parte del organismo, que, generalmente ocurre entre las 48h y 72h posteriores a la inyección (Mack *et al.* 2009). En un principio, la tuberculina no había sido propuesta como método diagnóstico, sino como fármaco. Al descubrir la tuberculina, Koch anunció que había descubierto la cura contra la tuberculosis, pero debido a los fuertes efectos secundarios que causaba su administración, tales como fiebre y vómito, se descartó como fármaco y años después empezó a ser utilizada como método diagnóstico (Huebner 1993). Para obtener la tuberculina, Koch cultivaba a los bacilos del tubérculo en medios glicerinados de caldo de carne, los sometía a una temperatura de 100°C para matarlos y por último, concentraba el cultivo hasta obtener 1/10 de su volumen original. El inconveniente en este proceso es que la tuberculina obtenida estaba contaminada con residuos del caldo de carne. Actualmente la “tuberculina antigua” (OT por sus siglas en inglés) se obtiene por un método similar al que seguía Koch, con la diferencia del medio de cultivo que es sintético, generalmente, medio Sauton (Huebner, 1993).

Actualmente, la OT ya no se usa para las pruebas diagnósticas, se usa el PPD (Protein Purified Derivative) un compuesto de varias proteínas de bajo y mediano peso molecular que contiene menor número de carbohidratos que la OT y por lo tanto es más específico. (Huebner 1993) El PPD es una mezcla de antígenos que se encuentran en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, y algunas otras especies de micobacterias presentes en el medio ambiente (Mack *et al.* 2009). El PPD se originó en 1932, cuando Seibert y Muday aislaron una proteína de bajo peso molecular al precipitar filtrados de bacilos con ácido tricloroacético. Descubrieron que al aplicar bajas dosis de este producto, se podía detectar con cierto grado de especificidad si los humanos o algunos animales como los conejillos de indias, habían estado infectados con tuberculosis. A lo largo del tiempo, se han ido perfeccionando las técnicas de obtención del PPD, actualmente ya existe un estándar para su preparación. Todos los PPDs que se preparan en EEUU se comparan con éste estándar adoptado por la OMS (Huebner, 1993).

Debido a que el número de antígenos contenidos en el PPD son compartidos por varias micobacterias, este tipo de método diagnóstico tiene muy poca especificidad en poblaciones que han sido vacunadas con BCG

² Tabla modificada de Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993) para tratar la tuberculosis (Secretaría de Salud, 2008)

o que se encuentran en ambientes con importante presencia de micobacterias saprófitas y no siempre permite identificar a los individuos infectados de los que tienen reacciones cruzadas (Doherty *et al.* 2009).

- Pruebas *ex-vivo* o por cuantificación de liberación de Interferón- γ

Las pruebas diagnósticas *ex-vivo* se realizan a partir de tomas de sangre periférica y se diferencian de la prueba de TST porque se basan en una detección antígeno-específica. Estas pruebas se fundamentan en la respuesta del hospedero hacia MTB por parte de las células T, que al adoptar una inmunidad adquirida tras haber estado en contacto con el patógeno, liberan interferón- γ (IFN- γ). Dentro de las pruebas *ex vivo* se pueden distinguir tres principales, dos de ellas basadas en la técnica de ELISA: QuantiFERON-TB Gold Test y QuantiFERON-TB In-Tube test, y otra basada en la técnica de EliSPOT: T-SPOT.TB (Richeldi 2006).

La prueba QuantiFERON-TB Gold Test consiste en una prueba de ELISA a partir de una muestra de sangre total en la que se busca detectar la liberación de IFN- γ al medio.

Actualmente, existe una versión más nueva de esta prueba y se conoce como QuantiFERON-TB In-Tube test. Este tipo de método diagnóstico se basa en los mismos fundamentos, la única diferencia es que utiliza tubos que ya contienen los antígenos micobacterianos. Esto facilita el trabajo en el laboratorio además de que permite que la prueba pueda realizarse fuera del laboratorio en lugares con pocos recursos de material e instalaciones (Richeldi, 2006).

La otra prueba diagnóstica *ex-vivo* es la T-SPOT.TB desarrollada por el Profesor Lavani y sus colaboradores. Esta prueba hace uso de los avances en genómica micobacteriana que han logrado identificar dos proteínas útiles en el diagnóstico de tuberculosis: ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target Protein 6) y CFP10 (Culture Filtrate Protein 10). Tanto ESAT-6 como CFP10 son blancos principales del IFN- γ secretado por los linfocitos T en individuos infectados con MTB (Richaldi et al. 2006). Además, estas últimas, únicamente se encuentran codificadas en un segmento único conocido como “Region of Difference 1” (RD1) que se encuentra en MTB pero está ausente en todas las cepas de *M.bovis*, incluida BCG así como en la gran mayoría de todas las micobacterias no tuberculosas presentes en el medio ambiente (Richeldi 2006).

A pesar de ser muy similares, dichas pruebas tienen algunas diferencias entre ellas. En el caso de QuantiFERON-TB Gold Test se utiliza una muestra de sangre completa en la que el número de leucocitos presentes es desconocido. En la prueba T-SPOT.TB sí hay una cuantificación de las células mononucleares presentes en sangre periférica. Debido a esta diferencia, los resultados obtenidos son también diferentes. En el primer caso, la información obtenida corresponde a la cantidad de IFN- γ que se encuentra en el

sobrenadante de la sangre con las células que fueron estimuladas con antígenos micobacterianos. En el segundo caso, debido a que hubo una cuantificación previa, el resultado corresponde a la frecuencia de células T específicas que producen IFN- γ . Con base en el tipo de resultados obtenidos, se considera que la prueba ELISpot es más sensible, pues es capaz de detectar la producción de IFN- γ por la célula T que lo liberó cuando aún se encuentra en una alta concentración de manera local. En la prueba de QuantiFERON-TB Gold Tests, el IFN- γ que se mide se difunde en el medio y por lo tanto se diluye en el volumen total de la muestra (Richeldi, 2006).

Otro de los retos a los que se enfrentan las pruebas diagnósticas, además de las reacciones cruzadas, es a los falsos negativos que pueden ocurrir, por ejemplo, en la prueba de TST cuando el paciente está inmunocomprometido. Estos son falsos negativos que ocurren porque el paciente ya no cuenta con la capacidad de inducir una respuesta inmune de hipersensibilidad a la inyección intradérmica de PPD, y en general, la sensibilidad del TST en pacientes con casos de VIH es del 50%. En este tipo de casos se considera que las pruebas sanguíneas pueden ser más efectivas. En estudios comparativos realizados en poblaciones africanas en condiciones de malnutrición y con VIH, se observó que la tasa de sensibilidad del ELISpot era significativamente mayor que la de TST (Richeldi, 2006).

Se han realizado múltiples estudios comparativos para las pruebas diagnósticas de IGRAs y TST en diferentes poblaciones y bajo diferentes condiciones. Uno de ellos se realizó en la población Inuita de Nunavut, una región del norte de Canadá que se considera la de más alta incidencia de tuberculosis en el país. El estudio realizado en esta región consistió en evaluar ventajas y desventajas de la prueba de IGRAs, pues si bien es más específica que la de TST también presenta algunos inconvenientes tales como resultados indeterminados, problemas para realizar la flebotomía en niños, la necesidad de un laboratorio bien equipado (generalmente ausente en áreas remota como ésta) y el alto costo que genera. El estudio determinó que la prueba de IGRAs era factible y los resultados indeterminados en este estudio no fueron significativos. Además se realizaron dos tipos de comparaciones: TST positivo/IGRA negativo y TST negativo/IGRA positivo. La concordancia total entre las dos pruebas fue de 82% y la discordancia total tomando en cuenta los dos grupos comparativos fue de 17.2%, pero el grupo de mayor discordancia fue el de TST positivo/IGRA negativo con una discordancia de 15.6% y un valor de kappa significativo (0.57%). Por otra parte, se constató que había discordancia entre las pruebas según si los individuos habían sido vacunados con BCG o no. Además, también se puso en evidencia que el mayor grado de discordancia ocurrió cuando los individuos recibieron múltiples vacunas BCG, seguido por los que recibieron la vacuna después de la infancia y el menor número de casos discordantes ocurrió cuando los individuos recibieron la vacuna durante la infancia (Alvarez *et al.*, 2014).

Todos estos resultados permitieron concluir que en poblaciones como la Inuita (o similares) las cuales en su mayoría están vacunados con BCG, la prueba de IGRAs es factible pues la mayoría tenían conocimiento de sus resultados puesto que no se requería de una segunda visita al médico, contrariamente a la prueba del TST en la que no todos los pacientes acuden a la siguiente cita y por lo tanto no se puede dar un seguimiento en caso de resultados positivos. Se considera que en esta población, el diagnóstico por IGRAs podría incrementar la especificidad y por lo tanto reducir en un 15% el número de casos en los que se le ofrece tratamiento preventivo a personas que no tiene LTB pero son diagnosticadas como tal debido a falsos positivos en el TST. Esto es importante pues los tratamientos profilácticos tienen fuertes efectos secundarios además de que requieren supervisión médica a lo largo de los 6 a 9 meses de tratamiento y son costosos (Alvarez *et al.*, 2014).

De manera similar, Mattos de Souza, señala que es muy importante tomar en cuenta estas discordancias, especialmente en países de bajos recursos en los que convergen un conjunto de factores como alta incidencia de TB, alta tasa de vacunación con BCG y de micobacterias saprófitas en el medio ambiente. Todos estos factores influyen de manera directa en los resultados de las pruebas diagnósticas y los dos últimos son susceptibles de generar reacciones cruzadas y falsos positivos en la prueba de TST. En la población brasileña en donde la incidencia de TB es importante (33%), existen discordancias entre las pruebas, sobre todo cuando varían los criterios establecidos para la prueba de TST. Cuando el punto de corte era menor para TST (5mm), había más resultados positivos (60.8%) que cuando el punto de corte era mayor (10 mm), para el cual el porcentaje de resultados positivos equivalía a 40%. Esto resultados tuvieron una alta discordancia con los obtenidos por IGRAs pues sólo un 27% fueron positivos (de Souza *et al.*, 2014).

Por otra parte, es importante tomar en cuenta estudios en poblaciones diferentes, originarias de países desarrollados, con menor número de micobacterias saprófitas en el ambiente, menor, incidencia de tuberculosis y por lo tanto menor tasa de vacunación con BCG. Por ejemplo, en la población alemana, se observó cierto grado de discordancia entre las pruebas. Un estudio en 62 centros de salud en Alemania realizado en pacientes que eran candidatos para tratamientos anti-TNF y que por lo tanto habían sido diagnosticados como LTB negativos. El diagnóstico se realizó en 1409 pacientes por medio de rayos X del torax, TST y alguno de los tipos de IGRAs (T-SPOT.TB ó Quantiferon TB Gold). Se consideraron TST positivos a partir de 5mm de induración, TSPOT positivos a partir de 6 spots. De acuerdo a los resultados obtenidos en ambas pruebas diagnósticas se constató que la concordancia entre IGRAs y TST era de un 89.5%, sin embargo el valor de kappa, si bien fue significativo, fue bajo (0.40) lo que indica que la concordancia tiene un nivel aceptable pero no bueno. La concordancia entre los dos tipos de pruebas diagnósticas disminuyó cuando los individuos estaban vacunados. Por otra parte, es importante tomar en

cuenta que este estudio se realizó en un país con baja incidencia de tuberculosis por lo que un TST positivo en un individuo sin vacuna BCG se puede considerar como prueba suficiente para LTB. Esto no es el caso en los países de alta incidencia, debido a que generalmente hay altas tasas de vacunación con BCG y las tasas de contagio son mayores, por lo tanto puede haber resultados falsos positivos (Kleinert *et al.*, 2012).

En Corea del Sur, en dónde la población también es de baja incidencia de tuberculosis y las condiciones de vida corresponden a las de un país desarrollado, también se concluyó a partir de un estudio comparativo que la prueba de IGRAs, tiene mayor especificidad que la TST, en la población coreana la especificidad fue del 98%-100% y la sensibilidad del 79%-97% para la prueba de IGRAs. Las pruebas de IGRAs no se ven afectadas en cuanto a la especificidad de sus resultados por la vacuna BCG, por lo que esta prueba diagnóstica se considera más confiable que la de TST para poblaciones vacunadas (Jang *et al.*, 2014).

En individuos inmunocompetentes con LTB, se ha comprobado que T.SPOT.TB parece ser más sensible que TST y también en pacientes con TB, incluidos aquéllos que tienen inmunidad celular comprometida y representan una alta probabilidad de obtener un resultado falso negativo en la prueba TST. Es importante resaltar que QuantiFERON-TB Gold parece tener una sensibilidad similar a la de TST en individuos LTB inmunocompetentes, pero mayor especificidad, incluso similar a la de T.SPOT.TB en cuanto a pacientes con TB activa (Richeldi, 2006).

A partir de estudios en individuos LTB de diferentes poblaciones, se puede afirmar que las pruebas diagnósticas basadas en sangre parecen tener mayor especificidad, sobre todo en aquellas poblaciones que han sido vacunadas con BCG y son de alta incidencia de TB. Debido a la especificidad antigénica que existe en las pruebas sanguíneas, se ha descartado en gran medida la posibilidad de que ocurran reacciones cruzadas con BCG y falsos positivos como en el caso de las pruebas TST basadas en PPD. Por otra parte, las nuevas pruebas sanguíneas incluyen un control positivo interno, por ejemplo, una muestra estimulada con un estímulo potente no-específico de IFN γ . Estos controles permiten tener mayor control sobre errores técnicos. Sin embargo, el diagnóstico de individuos LTB sigue siendo un problema, pues aún no hay una prueba confiable que permita identificarlos (Maertzdorf *et al.*, 2012). Esto se debe de acuerdo con algunos investigadores a que las pruebas utilizadas únicamente miden la persistencia de una respuesta inmune hacia antígenos de micobacterias pero no miden de manera específica la presencia de micobacteria o algún otro compuesto que sea característico de la condición definida como “tuberculosis latente”. El hecho de que las pruebas diagnósticas arrojen un resultado positivo al ser estimuladas por antígenos de la micobacteria no significa que haya presencia de MTB en el hospedero (Mack *et al.*, 2009).

De acuerdo con la OMS, en países de bajos recursos económicos, se recomienda que todas las personas con VIH y los niños mayores de 5 años que tienen LTB, sean tratados.

Existen varias modalidades de tratamientos para LTB, y a pesar de haber realizado algunos estudios comparativos, no se pudo llegar a un consenso sobre el mejor régimen de tratamiento por lo que la OMS propone las siguientes modalidades: 6 meses de tratamiento con INH, 9 meses de tratamiento con INH, un régimen de 3 meses con dosis semanales de INH y rifampicina, un régimen de 3 a 4 meses de INH con rifampicina o 3 a 4 meses de rifampicina. La pirazinamida fue excluida debido a su alto grado de toxicidad (World Health Organization, 2015).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud, el régimen para el tratamiento profiláctico en individuos con tuberculosis latentes es el siguiente: isoniazida por vía oral durante seis meses, a dosis de 5 a 10 mg. por kilogramo de peso por día, en una toma, sin exceder de 300 mg.

Evaluar la eficacia del tratamiento con INH de la LTB no es una tarea fácil. Al no existir datos clínicos de la enfermedad o diagnóstico bacteriológico, la evaluación de la eficacia del tratamiento de la TB latente se ha limitado a ensayos clínicos donde se determina la eficacia del tratamiento con INH a través del seguimiento de los participantes y el desarrollo de TB activa confirmada bacteriológicamente en los que recibieron el tratamiento y su comparación con los individuos que no recibieron tratamiento.

Planteamiento del problema

¿Existen diferencias transcriptómicas entre los individuos con tuberculosis latente con resultados diferentes para dos pruebas diagnósticas (TST+, IGRAS+ T0 vs. TST+, IGRAS-) antes y después del tratamiento?

Hipótesis

Es posible distinguir diferencias en los perfiles génicos de individuos con tuberculosis latente con resultados diferentes a dos pruebas diagnósticas (TST+, IGRAS+ T0 vs. TST+, IGRAS-). así como el efecto del tratamiento profiláctico con INH a lo largo del tiempo (T0, T1 y T6).

Objetivos generales

Evaluar las diferencias transcriptómicas de la respuesta al tratamiento con isoniazida en pacientes con LTB TST+ IGRAS+ y TST+ IGRAS-.

Objetivos particulares

1. Evaluar las diferencias transcriptómicas entre individuos con tuberculosis latente, pertenecientes a dos grupos diagnósticos, antes del tratamiento (PPD+, IGRAS+ T0 vs. PPD+, IGRAS- T0)
2. Evaluar las diferencias transcriptómicas entre individuos con tuberculosis latente, pertenecientes a dos grupos diagnósticos (TST+ IGRAS+ T1 vs. TST+ IGRAS- T1). después de un mes de tratamiento con isoniazida.

Evaluar las diferencias transcriptómicas entre individuos con tuberculosis latente, pertenecientes a dos grupos diagnósticos (TST+ IGRAS+ T6 vs. TST+ IGRAS- T6) después de 6 meses de tratamiento con isoniazida.

Materiales y Métodos

Población de estudio

El tamaño de muestra se decidió a conveniencia, tomando en cuenta la disponibilidad de muestras y el alto costo de los microarreglos.

Criterios de inclusión: Individuos mayores de 16 años, con carta de consentimiento informado, sanos con un resultado positivo a la prueba intradérmica a la tuberculina (TST) que hayan estado en contacto directo con individuos con TB activa.

Criterios de exclusión: individuos con síntomas clínicos o radiológicos de TB o historia previa de TB. diabetes, VIH o enfermedades autoinmunes, hepáticas o infecciosas. Historia de mal funcionamiento hepático o contraindicación de tomar el medicamento. Por último no podían ser mujeres embarazadas ni personas con problemas de alcoholismo o drogadicción.

De acuerdo a los criterios mencionados, se colectaron un total de 18 muestras pertenecientes a 6 individuos durante los años 2008 y 2009.

Las muestras de sangre se obtuvieron por flebotomía y se colectaron en tubos PAXgene™ Blood RNA Tube (PreAnalytiX/ QIAGEN) para evitar que hubiera cambios en la expresión del RNA.

Dentro de los voluntarios que conformaron el grupo de estudio se hicieron dos categorías, 1) Individuos TST+, IGRAS+ y 2) Individuos TST+, IGRAS-. A ambos grupos se les administro tratamiento con INH durante 6 meses. Las dosis administradas fueron aquéllas sugeridas por la **Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud, es decir dosis diarias de 5 a 10 mg de isoniácida por vía oral durante seis meses, sin exceder de 300 mg.**

- Grupo 1 (n=3): Individuos TST+, IGRAS+ antes del tratamiento (T0), después de un mes con tratamiento con isoniazida (T1) y al finalizar el tratamiento de 6 meses con isoniazida (T6)

- Grupo 2 (n=3): Individuos TST+, IGRAS- antes del tratamiento (T0), después de un mes con tratamiento con isoniazida (T1) y al finalizar el tratamiento de 6 meses con isoniazida (T6)

Para confirmar que los individuos se hubieran apegado al tratamiento con INH se realizó un monitoreo de los metabolitos de INH excretados en la orina utilizando el kit de tiras *Taxo-INH*.

Una vez que se obtuvieron las muestras de sangre se congelaron y mantuvieron a -70 °C hasta el momento de la extracción de RNA por el método de columnas con el kit PreAnalytix de Qiagen.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó por el método de columnas de sílica con el kit de extracción de RNeasy de QIAGEN. El fundamento de la técnica consiste en 4 pasos esenciales. El primero es una lisis celular y en la inactivación de nucleasas por medio de agentes caotrópicos, por ejemplo la guanidina-tiocinato o enzimas. El segundo paso consiste en separar el RNA de todos los demás compuestos como proteínas y DNA. Para esto generalmente se usa isopropanol. El tercer paso es el lavado de RNA para eliminar sales y residuos de proteínas y otros componentes celulares, esto se hace con agentes con bajo contenido caotrópico. Por último, se eluye el RNA en agua libre de RNasas (Chomczynski 2006).

Para extraer el RNA fue necesario descongelar los tubos PAXgene a temperatura ambiente durante al menos 2 horas, para garantizar la hemólisis de la sangre.

Posteriormente se centrifugaron los tubos a 5000g (2000rpm) durante 25 minutos a temperatura ambiente (Microcentrifuga 5417R/ Eppendorf). Se descartó el sobrenadante y se les adicionaron 4 ml de agua libre de RNasa a los botones. Se re-suspendieron los pellets por vortex, y se centrifugaron nuevamente a 5000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez más, se eliminaron los sobrenadantes y se agregaron 350 µl de buffer de resuspensión, hasta disolver los botones. Se transfirió el contenido de los tubos a otros de 1.5 ml y se les agregaron 300 µl de buffer de unión y 40 µl de proteinasa K. Se mezclaron por vortex y se incubaron 10 minutos a 55°C con una agitación de 1000 rpm (Thermo-Shaker, TS 100C/ bioSan). A continuación se transfirieron las muestras a columnas de disrupción PAXgene introducida en un tubo de procesado y se centrifugaron 3 minutos a (12000rpm). Se desecharon las columnas de disrupción y el sobrenadante eluido de las columnas se colocó en tubos de 1.5ml, procurando no tomar los botones. Posteriormente se agregaron 350 µl de etanol (96-100% pureza) a los tubos con el sobrenadante, se mezclaron por vortex y se centrifugaron 5 segundos a 500 g. Posteriormente, se tomaron 700 µl de la muestra y se transfirieron a columnas PAXgene de centrifugación de RNA introducida en un tubo de procesado. Se centrifugaron las muestras 1 minuto a (12000rpm).

Se desechó el tubo de procesado y se transfirió la columna a un tubo de procesado nuevo. Se transfirió por pipeteo el resto de la muestra de la primera elución en la columna. Se centrifugó 1 minuto a (12000rpm) y se transfirió la columna a un tubo de procesado nuevo. Se agregaron 350 µl de buffer de lavado 1 (BR3) en las columnas, se centrifugaron 1 minuto a 12000 rpm y se colocaron las columnas en tubos de procesado nuevos agregándoles 80 µl de una mezcla de DNAasa I y tampón de digestión de DNA, directamente en la membrana de la columna. Para preparar esta solución se mezclaron 10 µl de DNAsa I con 70 µl de tampón de digestión de DNA en un tubo de 1.5 ml. Una vez que se le agregó a las muestras la mezcla de DNAsa I con tampón de digestión de DNA se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 15min. Posteriormente se agregaron 350 µl de tampón de lavado 1 (BR3) en la columna y se centrifugaron las muestras 1 minuto a 1200rpm. Se transfirieron las columnas a tubos de procesado nuevos. Se agregaron 500 µl de buffer de lavado 2 (BR4) en las columnas y se centrifugaron 1 minuto a 12000rpm (este paso se repitió dos veces para un mejor lavado). Después del segundo lavado, se transfirieron las columnas a tubos de procesado nuevos, se agregaron 500 µl de tampón de lavado 2 (BR4) y se centrifugaron las muestras 3 minutos a 1200rpm. Se transfirieron las columnas a tubos de procesado nuevos y se centrifugaron 1 minuto a 12000 rpm. Una vez más, se transfirieron las columnas a tubos de 1.5ml, se agregaron 60 µl de agua libre de RNAasa directamente en la membrana de la columna y se centrifugaron 1 minuto a 8000 rpm para eluir el RNA en el mismo tubo. Una vez eluído, se incubó el RNA durante 5 minutos a 65°C sin agitación de tal forma que se desnaturalizó el RNA para poder ser utilizado posteriormente. Una vez que termina la incubación es importante transferir inmediatamente las muestras al hielo.

El RNA extraído se almacenó a -20 o -70°C para evitar su degradación (PreAnalytiX GmbH, 2009).

Cuantificación y análisis de pureza e integridad del RNA

Para cuantificar el RNA extraído se midió la concentración del RNA por espectrofotometría con Nanodrop. La concentración del RNA debe medirse a una absorbancia de 260nm, pues ésta es la longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos. La pureza del RNA también se midió por espectrofotometría en el Nanodrop. Para esto se midió la relación de la absorbancia a diferentes longitudes de onda. La relación A280/260 indica la pureza de la muestra. Los elementos que tienen absorbancia a 260nm son los ácidos nucleicos y a 280nm son principalmente proteínas pero también algunos contaminantes como fenol. Se considera que la muestra está pura cuando el valor de la absorbancia de esta relación está entre 1.8 y 2.2. La relación A260/230 sirve para saber si hubo contaminación por fenol, pues este elemento absorbe a 230nm. Para asegurarse que el RNA esté puro debe de obtenerse un valor aproximado de 2.2, esto garantiza que no contiene DNA, pues el valor de RNA es más elevado debido a la absorbancia de la base U que es más elevado que la de T. La integridad del RNA se evaluó por Bionalizador (Agilent 2100). Para obtener la integridad del RNA se usa la técnica de electroforesis en chip. Este chip está constituido por 16 pozos que

se encuentran conectados por canales. De los 16 pozos, 12 sirven para colocar las muestras que se quieren analizar. Los otros 4 son para el marcador de peso molecular y los geles. En cada uno de los 3 pozos marcados con la G, se deposita un gel que está constituido por un polímero y un marcador fluorescente, este polímero es el que va a permitir que se cree un circuito eléctrico en el que se pueda integrar la información de la muestra depositada en cada pozo. Las moléculas cargadas como el DNA o el RNA, migran de manera electroforética debido a un gradiente de voltaje. Debido a la proporción que existe entre carga y masa este gradiente se mantiene constante y las moléculas son separadas por tamaños. Además, las moléculas fluorescentes se intercalan entre el RNA de tal manera que son detectadas por un láser y posteriormente pueden ser traducidas en imágenes similares a las del bandeo de los geles de electroforesis.

La marcador de peso molecular (RNA 6000) con una concentración de 150 ng/μl contiene 6 fragmentos de RNA de diferentes tamaños: 0.2kb, 0.5kb, 1.0kb, 2.0kb, 4.0kb y 6.0kb. Cuando se lee el chip, el programa computacional compara las muestras con cada uno de los fragmentos del medidor de peso molecular, determina la concentración de la muestra e identifica los picos ribosomales de RNA (Agilent Technologies, 2008).

En esta técnica se evalúa la integridad del RNA ribosomal, pues el mRNA representa únicamente el 1-3% del RNA total de las muestras y es muy difícil de medir. Además se considera que el rRNA, por degradarse más fácilmente, es un buen parámetro para evaluar la integridad y la calidad del RNA. Dado que el rRNA de mamíferos tiene un tamaño de 5kb para el 28S y 2kb para el 18S se considera que una relación de 2:1 en la medida del rRNA es indicadora de RNA intacto. El Bioanalizador calcula el RIN que es el Número de Integridad del RNA. El RIN es una escala del 1 al 10 que se creó con base en la relación entre el 28S y el 18S y de un algoritmo que se elaboró a partir de varias muestras adquiridas por el "Eukaryote Total RNA Nano Assay" que incluyen 1300 muestras de RNA total de varios tejidos de tres especies diferentes (humano, rata y ratón). En esta escala, el 1 indica el material más degradado y el 10 el menos degradado (Mueller et al., 2004; Palmer, 2003).

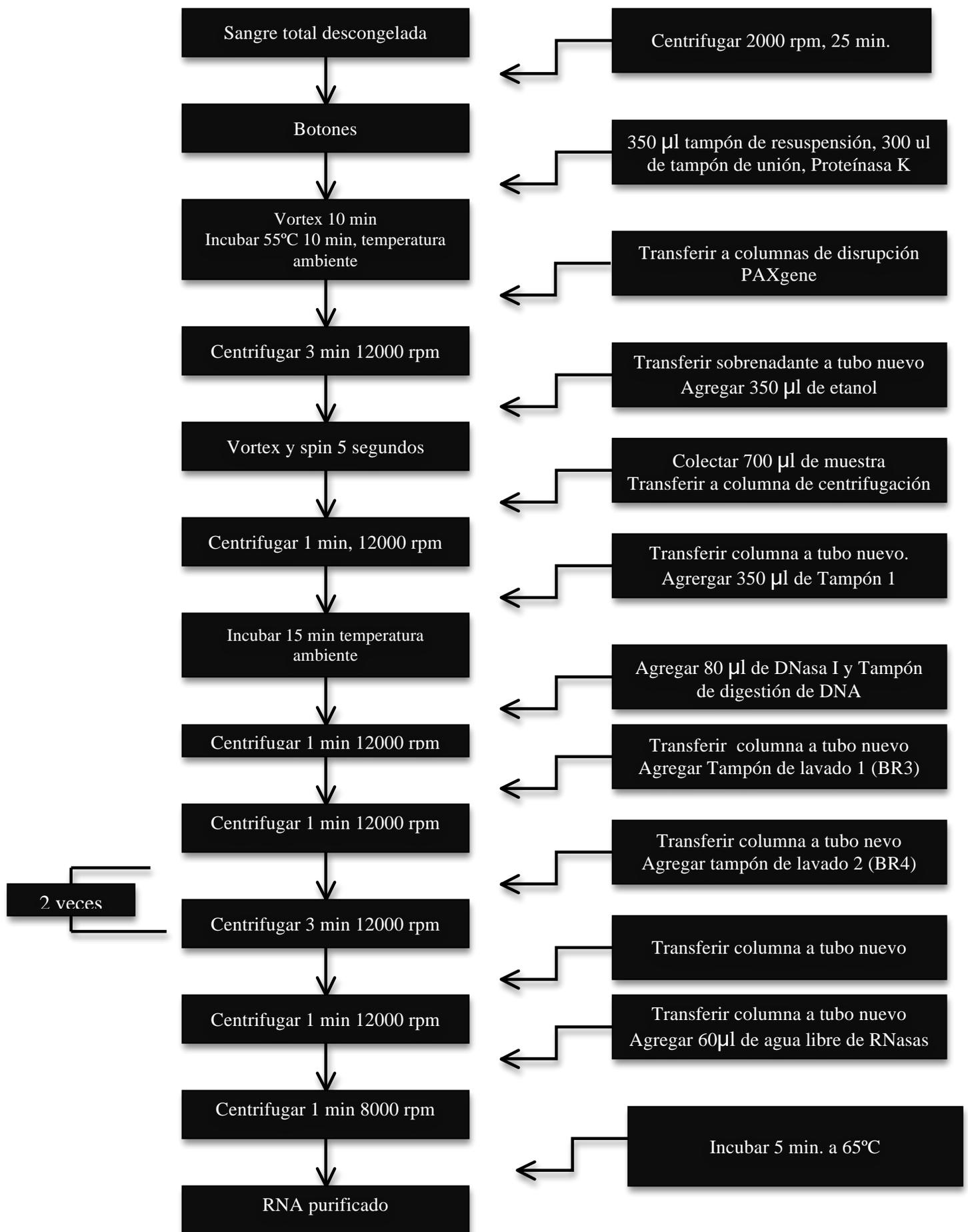


Figura 1: Diagrama de metodología de extracción de RNA

Procesamiento de Microarreglos

Los microarreglos de expresión son una técnica de biología molecular que permite el estudio de los productos de transcripción del genoma por medio de la adquisición y el análisis masivo de datos. Una de las ventajas de este tipo de ensayos, es que permiten el estudio completo en una sola reacción. Los datos obtenidos a partir de microarreglos pueden proveer información cuantitativa sobre procesos y vías celulares así como información genómica que puede relacionarse con estímulos internos o externos que alteran el estado fisiológico. Esta técnica tiene un gran número de aplicaciones dentro de las cuales, una de las más importantes en cuanto a información biológica, es la de monitorear la expresión génica para poder asociarla a algún estímulo (Schena *et al.* 1998).

El desarrollo de microarreglos de cDNA ha permitido explorar la función del genoma y comprenderlo mejor. Resulta una técnica muy poderosa, pues el apareamiento de los pares de bases se da con gran especificidad y afinidad de tal forma que es posible realizar un perfil de expresión a escala genómica.

Las características que le dan gran valor a ésta técnica de estudio del genoma son: 1) es una técnica sencilla que permite medir los transcritos para cada gen en un solo experimento. 2) hay una fuerte conexión entre la función del producto de un gen y su patrón de expresión pues, en general, es posible afirmar que cada gen se expresa en células determinadas bajo condiciones o estímulos específicos en los que la expresión del gen contribuye a la aptitud de cada célula. 3) los promotores responden a señales de su entorno por medio de cambios en el nivel de transcripción de ciertos genes específicos. Los microarreglos permiten comprender la dinámica molecular de los organismos (Brown *et al.* 1999).

Los microarreglos de cDNA, aportan información sobre cada uno de los genes que se encuentran representados en el chip. Los datos obtenidos del análisis de expresión sirven para poder relacionar los genes con ciertas funciones. Los transcritos con niveles constitutivos proveen información global pero sensible sobre el estado fisiológico de las células y los tejidos analizados. Esto se comprobó al realizar diversos estudios en los que se compararon los perfiles de expresión de células en diferentes condiciones (por ejemplo choque térmico, desórdenes metabólicos o enfermedades) y se observaron patrones de expresión específicos para las diferentes condiciones. Al establecer correlaciones entre los cambios en la expresión génica y los cambios fisiológicos específicos, es posible adquirir conocimiento sobre los procesos biológicos que ocurren en el organismo bajo diferentes condiciones. Si además, se generan bases de datos que contengan un registro de los cambios de la expresión de genes en poblaciones normales, se pueden tener mejores resultados ya que estos datos se pueden acoplar con los datos clínicos para realizar comparaciones y generar pronósticos de susceptibilidad patogénica asociada a marcadores de expresión específicos pues, en la mayoría de los casos, los patrones de expresión génica alterados, correlacionan con algún tipo de enfermedad. Los microarreglos de muestras de pacientes con alguna enfermedad pueden proveer información importante para el diagnóstico así como sobre la patología y blancos potenciales para

tratamientos. Si se encuentra un gen cuya expresión está dramáticamente alterada en una enfermedad específica, entonces es posible que sea un blanco fundamental para inhibición por pequeñas moléculas. Por todas estas razones, se considera a los microarreglos una herramienta muy útil y de un costo relativamente bajo para estudios de farmacología, toxicología y patogénesis (Schena *et al.*, 1998).

Para este trabajo se utilizaron los microarreglos de Affymetrix, específicamente el chip *Human Exon Gene 1.1ST array strip*. Estos chips, contienen 28 869 genes representados en 26 sondas a lo largo de cada gen y hay un total de 764 885 sondas diferentes. Los oligonucleotidos de las sondas tienen una longitud de 25 mers. Estos chips permiten analizar la totalidad del genoma en un solo ensayo, además por ser de exones, se mantiene la información del mRNA. El procesamiento de los microarreglos se hizo de acuerdo al manual como se indica a continuación.

Transcripción Reversa para Sintetizar la Primera Hebra de cDNA

Para poder iniciar la transcripción reversa se preparó la solución “First Strand Master Mix” de la siguiente manera:

Se colocaron el “First Strand Enzyme Mix” en hielo y el “First Strand Master Mix” (FSMM) en un tubo eppendorf libre de nucleasas a temperatura ambiente. Los volúmenes de las diferentes soluciones se mezclaron a temperatura ambiente de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3: Reactivos y cantidades necesarias para "*First Strand Buffer Mix*"

Componente	Cantidad para 1 muestra	FSMM para 4 muestras(+10%)
First Strand Buffer Mix	4 µl	17.6 µl
First Strand Enzyme Mix	1 µl	4.4 µl
Volumen Total	5 µl	22 µl

El FSMM se mezcló por vortex y se centrifugó durante 5 segundos. Posteriormente, se transfirieron 5 µl de FSMM a tubos individuales de PCR que se colocaron en hielo previamente. A estos tubos se les agregó 5 µl de la mezcla de control de Poly-A/ RNA total para obtener un volumen final de 10 µl. La solución se mezcló por vortex, se centrifugó y se incubó en el termociclador 1h a 25°C usando el programa “*first strand cDNA synthesis*”, posteriormente 1h a 42°C y por último, 2 minutos a 4°C. Al finalizar la incubación, se centrifugó la solución 5 segundos para coleccionar el cDNA en el fondo del tubo. Se colocaron las muestras en hielo por 2 minutos y se procedió a la síntesis de la segunda hebra de cDNA.

Síntesis de la segunda hebra de cDNA

Se pre-enfrió el termociclador a 16°C y se preparó el “*Second Strand Master Mix*” (SSMM) a 4°C y en un tubo libre de nucleasas, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4: Reactivos y cantidades para preparar "*Second Strand master Mix*"

Componente	Cantidades para 1 muestra	Second Strand Master mix para 4 muestras (+10%)
Agua libre de nucleasas	32.5 µl	143 µl
Second strand buffer mix	12.5 µl	55 µl
Second strand enzyme mix	5 µl	22 µl
Volumen Total	50 µl	220 µl

Una vez obtenido el SSMM, se mezcló con vortex y se centrifugó 5 segundos. Se transfirieron 50 µl de SSMM a cada 10 µl de muestra de cDNA. Las muestras obtenidas se mezclaron ligeramente por vortex, se centrifugaron brevemente y se colocaron en hielo. Posteriormente se incubaron 1h a 16°C y después 10 minutos a 65°C en el termociclador usando el programa “*Second strand cDNA Synthesis*”. Una vez terminada la incubación, se centrifugaron las muestras 5 segundos y se colocaron en hielo.

Transcripción *in Vitro* para sintetizar cRNA marcado

Se preparó la mezcla para la Transcripción *in Vitro* (MTIV) a temperatura ambiente, en un tubo libre de nucleasas de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5: Reactivos y cantidades para prepara la mezcla para transcripción *in vitro*

Componente	Cantidad para 1 muestra	MTIV para 4 muestras (+10%)
IVT Buffer mix	24 µl	105.6 µl
IVT Enzyme mix	6 µl	26.4 µl
Volumen Total	30 µl	132 µl

La solución obtenida se mezcló por vortex y se centrifugó 5 segundos. Se transfirieron 30 µl de MTIV a cada 60 µl de cDNA de doble hebra, se mezcló por vortex y se centrifugó brevemente. Las muestras se incubaron primero 16h a 40°C en el termociclador usando el programa “*In Vitro Transcription cRNA Synthesis*” y después se mantuvieron en el termociclador a 4°C. Al terminar, se colocaron las muestras en hielo para proceder a la purificación de cRNA.

Purificación de cRNA

Es importante realizar una purificación para eliminar enzimas y sales. Para poder iniciar la purificación de cRNA se realizó una alícuota de Solución de Elución (40 µl por muestra +10%) en un tubo de 1.5 ml, libre de nucleasas y se precalentó de 50° a 58°C durante 10 minutos.

Se preparó la mezcla de Unión a cRNA a temperatura ambiente, en tubos libres de nucleasas de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 6: Reactivos y cantidades para preparar la mezcla de unión a cRNA

Componente	Cantidad para 1 muestra	Mix de Unión a cRNA para 4 muestras (+10%)
Nucleic acid binding beads	10 µl	44 µl
Nucleic acid binding buffer concentrate	50 µl	220 µl
Volumen total	60 µl	264 µl

Se agregaron 60 µl de la mezcla de Unión a cRNA a cada muestra y se mezcló por pipeteo varias veces. Cada muestra se transfirió a una placa de fondo en U. A cada muestra se le agregaron 60 µl de isopropanol al 100% y se mezclaron varias veces por pipeteo. Posteriormente se agitaron cuidadosamente entre 2 y 5 minutos para permitir que el cRNA se uniera a las perlas. Una vez que transcurrió la incubación, se colocó la placa sobre la base magnética y se mantuvo ahí durante 5 minutos para poder capturar las perlas. Una vez que la mezcla se tornó transparente, se quitó cuidadosamente el sobrenadante.

Se retiró la placa de la base metálica y se lavaron las perlas magnéticas de RNA, para esto se agregaron 100 µl de “*Nucleic Acid Wash Solution*” a cada muestra y se agitó a velocidad moderada por 1 minuto. Se volvió a colocar la placa sobre la base magnética por 5 minutos para poder capturar las perlas magnéticas, se descartó el sobrenadante y se retiró la placa de la base metálica para volver a repetir este proceso de captura y lavado. Una vez terminado ese proceso se agitó vigorosamente la placa durante 1 minuto para secar las perlas .

A continuación, se eluyó el cRNA de la perlas, con 40 µl de precalentado que se agregó a cada muestra. Las muestras se incubaron durante 2 minutos sin agitación y al terminar la incubación se agitaron vigorosamente durante 3 minutos. Una vez que las perlas estuvieron completamente dispersas, se volvió a colocar la placa sobre la base magnética durante 5 minutos y se capturaron las perlas. El sobrenadante, que contiene el cRNA eluído, se transfirió a un tubo de PCR libre de nucleasas y se determinaron tanto la pureza como la integridad del cRNA.

Síntesis del segundo ciclo de cDNA

Para la síntesis de cDNA, se requieren 10 µl de cRNA. En este procedimiento, se sintetiza una hebra de cDNA 3'-5' por medio de la transcripción reversa de cRNA usando *primers* aleatorios.

Es necesario preparar, en hielo, 455 ng/µl de cRNA, esto es equivalente a 10 µl en un volumen de 22 µl.

A continuación se combinaron los 10 µl de cRNA con 2 µl de los *primers* aleatorios, esto se realizó sobre hielo. Se mezcló suavemente por vortex y luego se centrifugó 5 segundos para que la muestra quedara en el fondo del tubo. Los tubos se incubaron en un termociclador durante 5 minutos a 70 °C, luego 5 minutos a 25 °C y por último 2 minutos a 4 °C. Después de la incubación se centrifugó la muestra por 5 segundos.

En seguida, se preparó la mezcla para el segundo ciclo. Esto se hizo sobre hielo de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 7: Reactivos y cantidades para preparar la mezcla de unión a cRNA

Componente	Cantidad para 1 muestra	Master Mix A para 4 muestras (+10%)
Buffer-Mix para el segundo ciclo	8 µl	35.2 µl
Enzyme Mix para el segundo ciclo	8 µl	35.2 µl
Volumen total	16 µl	70.4 µl

La mezcla obtenida se mezcló cuidadosamente por vortex y se centrifugó 5 segundos. Se transfirieron 16 µl de la mezcla para el segundo ciclo a cada muestra de cRNA con los *primers* aleatorios. Se mezcló cuidadosamente con vortex, se centrifugó por 5 segundos y se incubó por 10 minutos a 25 °C, por 90 minutos a 42 °C y por 10 minutos a 4 °C. Se centrifugó la muestra por 5 segundos y se colocó en hielo inmediatamente después.

Hidrólisis por medio de RNasa-H

En este procedimiento, se degrada del molde de cRNA por RNasa-H de tal forma que queda cDNA de una sola hebra. Esta reacción se realizó sobre hielo.

Se agregaron 2 µl de RNasa H al cDNA del segundo ciclo. Se mezcló por pipeteo 3 veces y se mezcló suavemente en el vortex. Posteriormente se centrifugó 5 segundos y se incubó por 45 minutos a 37 °C,

5 minutos a 95 °C y 2 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron 5 segundos y se colocaron inmediatamente sobre hielo.

Purificación del segundo ciclo de cDNA

Después de haber sintetizado la segunda hebra de cDNA, fue necesario purificarla para eliminar enzimas, sales y dNTPs que no se incorporaron.

Antes de iniciar con la purificación, debió de calentarse la botella de "*Elution Solution*" a 58° C por lo menos durante 10 minutos y haberle agregado etanol a la botella de "*Nucleic Acid Wash Solution Concentrate*". Además debió de asegurarse que el "*Nucleic Acid Binding Buffer Concentrate*" estaba completamente disuelto y si no lo estaba, se procedió a calentarlo a 50°C para solubilizarlo. Se deben mezclar bien por vortex las perlas magnéticas para unión de ácidos nucleicos.

Se preparó la mezcla de unión al cDNA para cada una de las muestras, Esto se hizo a temperatura ambiente en un tubo libre de nucleasas, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 8: Reactivos y cantidades para preparar la mezcla de unión a cDNA

Componente	Cantidad para 1 muestra	Master Mix A para 4 muestras (+10%)
Perlas magnéticas para ácidos nucleicos	10 µl	44 µl
Nucleic acid binding buffer concentrate	50 µl	220 µl

A continuación, se le agregaron a cada mezcla 18 µl de agua libre de nucleasas para obtener un volumen de 60 µl. Los 60 µl obtenidos de mezcla de unión a cDNA se le agregaron a cada muestra y se mezcló por pipeteo 3 veces. Las muestras se transfirieron a una placa de fondo de U. Se le agregaron 120 µl de etanol al 100 % a cada muestra y se mezcló por pipeteo 3 veces. Se colocó la placa sobre el agitador y se mezclaron las muestras durante 2 minutos y a continuación se colocó la placa sobre la base magnética para realizar la captura de DNA. Después de 5 minutos se completó la captura y el sobrenadante se tornó transparente. Se descartó el sobrenadante con una pipeta y se retiraron las muestras de la placa magnética. Se prosiguió con el lavado que se realizó dos veces. Se agregaron 100 µl de "*Nucleic Acid Wash Solution*" a cada muestra y se agitaron las mezclas a velocidad moderada durante 1 minuto en el agitador para la placa. Nuevamente se colocó la placa de fondo de U sobre la base magnética para capturar las perlas magnéticas, se aspiró por medio de una pipeta y descartó el sobrenadante. Después del segundo lavado se transfirió la placa de fondo de U al agitador y se agitó vigorosamente durante 1 minuto para evaporar el etanol. Posteriormente, se eluyó el cDNA purificado de las perlas magnéticas. Para esto se añadieron, a

cada muestra, 30 μl de "Elution Solution" previamente calentada a 58°C y se incubaron las muestras por 2 minutos sin agitación y a temperatura ambiente. Después, se colocó la placa de fondo de U sobre el agitador y se agitó vigorosamente por 3 minutos hasta que las perlas quedaran completamente dispersas. La placa se colocó sobre la base magnética y se realizó la captura de perlas magnéticas. El sobrenadante que ya contenía el cDNA eluído se transfirió a tubos libres de nucleasas y se colocaron inmediatamente en hielo. Antes de proseguir, se determinó la concentración del cDNA por medio de espectrofotometría, se midió con un Nanodrop de 1.5 μl de cDNA a 260nm.

Fragmentación del segundo ciclo de cDNA

La fragmentación del cDNA se preparó en tubos de 0.2 ml de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 9: Reactivos y cantidades para preparar la mezcla de fragmentación de cDNA

Componente	Cantidad para 1 muestra	Master Mix A para 4 muestras (+10%)
cDNA de una sola hebra	8 μl	5.5 μg
Agua libre de RNasa	8 μl	31.2 μl
Volumen total	16 μl	31.2 μl

Posteriormente se preparó la mezcla para fragmentación de cDNA en tubos de 0.5 ml de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 10: Reactivos y cantidades para preparar la mezcla de fragmentación

Componente	Cantidades para 1 muestra	Master mix para 4 muestras (+10%)
Agua libre de nucleasas	10 μl	44 μl
10X buffer de fragmentación de cDNA	4.8 μl	21.1 μl
UDG 10 U/μl	1 μl	4.4 μl
APE 1 1000 U/μl	1 μl	4.4 μl
Volumen Total	16.8 μl	73.9 μl

Se agregaron 16.8 μl de la mezcla de fragmentación a 31.2 μl la mezcla de cDNA para ser fragmentada que se preparó previamente. Se mezcló suavemente por vortex y se incubó la reacción a 37 °C por 60 minutos, luego a 93 °C por 2 minutos y por último a 4 °C por 2 minutos. Se mezclaron los tubos por inversión, se centrifugaron 5 segundos y se transfirieron 45 μl de la muestra a otros tubos de 0.2 ml.

Marcado de la hebra de cDNA fragmentado

Se preparó la mezcla para marcar el DNA de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 11: Reactivos y cantidades para preparar la mezcla para marcado

Componente	Cantidades para 1 muestra	Master mix para 4 muestras (+10%)
A5X TdT Buffer	12 μ l	52.8 μ l
TdT, 30 U/μl	2 μ l	8.8 μ l
Reactivo para marcar DNA, 5mM	1 μ l	4.4 μ l
Volumen Total	15 μ l	66 μ l

Se agregaron 15 μ l de la mezcla para marcado a cada una de las muestras fragmentadas (45 μ l) y se mezclaron por inversión. Posteriormente se incubaron las reacciones a 37 °C por 60 minutos, a 70 °C por 10 minutos y a 4 °C por 2 minutos.

Hibridación

Antes de empezar la hibridación se sacó la tira del microarreglo que estaba a 4°C para que empiece equilibrarse con la temperatura ambiente.

Se programó la temperatura de la estación de hibridación Gene Atlas a 48 °C y se oprimió el botón "Start". Además fue necesario mantener los siguientes viales a temperatura ambiente:

- 5X WT Hyb Add 1
- 15 X WT Hyb Add 4
- 2.2 X WT Hyb Add 6
- Control Oligonucleotide B2 (3 nM)

Estos mismos viales, se agitaron por vortex y se centrifugaron por 5 segundos.

El vial que contenía el "*Control Oligonucleotide B2 (3 nM)*" y "*20X Eukariotic Hybridization Controls*" se mantuvieron en hielo.

Se preparó la mezcla de hibridación WT de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 12: Reactivos y cantidades para preparar la mezcla de hibridación

Componente	Cantidades para 1 muestra	Cantidad para 4 muestras (+10%)
5X WT Hyb Add 1	30 μ l	132 μ l
Control Oligonucleotide B2 (3 nM)	1.5 μ l	6.6 μ l
20X Hybridization Controls	7.5 μ l	33 μ l
15X WT Add 4	10 μ l	44 μ l
Volumen Total	49 μ l	215.6 μ l

A partir de la mezcla preparada, se hizo una alícuota de 49 μ l en cada uno de los tubos que se agregaron 41 μ l del DNA fragmentado y marcado y se agregaron también 60 μ l de "2.5X WT Hyb Add 6" de tal forma que se obtuvo un total de 150 μ l en cada tubo. Se centrifugó cada tubo por 5 segundos y se procedió a la desnaturalización del coctel de hibridación a 99 °C durante 5 minutos y posteriormente a 45 °C por 5 minutos. Después de desnaturalizar las muestras, se centrifugaron a 5000 RPM durante 1 minuto para remover cualquier material insoluble que pudiese encontrarse en las muestras.

Una vez que se preparó esto, se aplicaron 120 μ l del coctel de hibridación en medio de los pozos de una charola de hibridación nueva. Se quitó la cobertura protectora del microarreglo y se colocó sobre la base. Se colocó la tira del microarreglo en la charola de hibridación que contenía las muestras con coctel de hibridación y se aseguró que no hubieran burbujas. En caso de haberlas, se eliminaron. Por último, se colocaron las charolas de hibridación con la tira de microarreglo en la estación de hibridación y se cerró la estación. Finalmente, se registraron las muestras en el programa computacional Gene Atlas para que se definieran los parámetros de tiempo y temperatura para la hibridación.

A continuación se presenta un diagrama que resume el método de procesamiento de microarreglos.

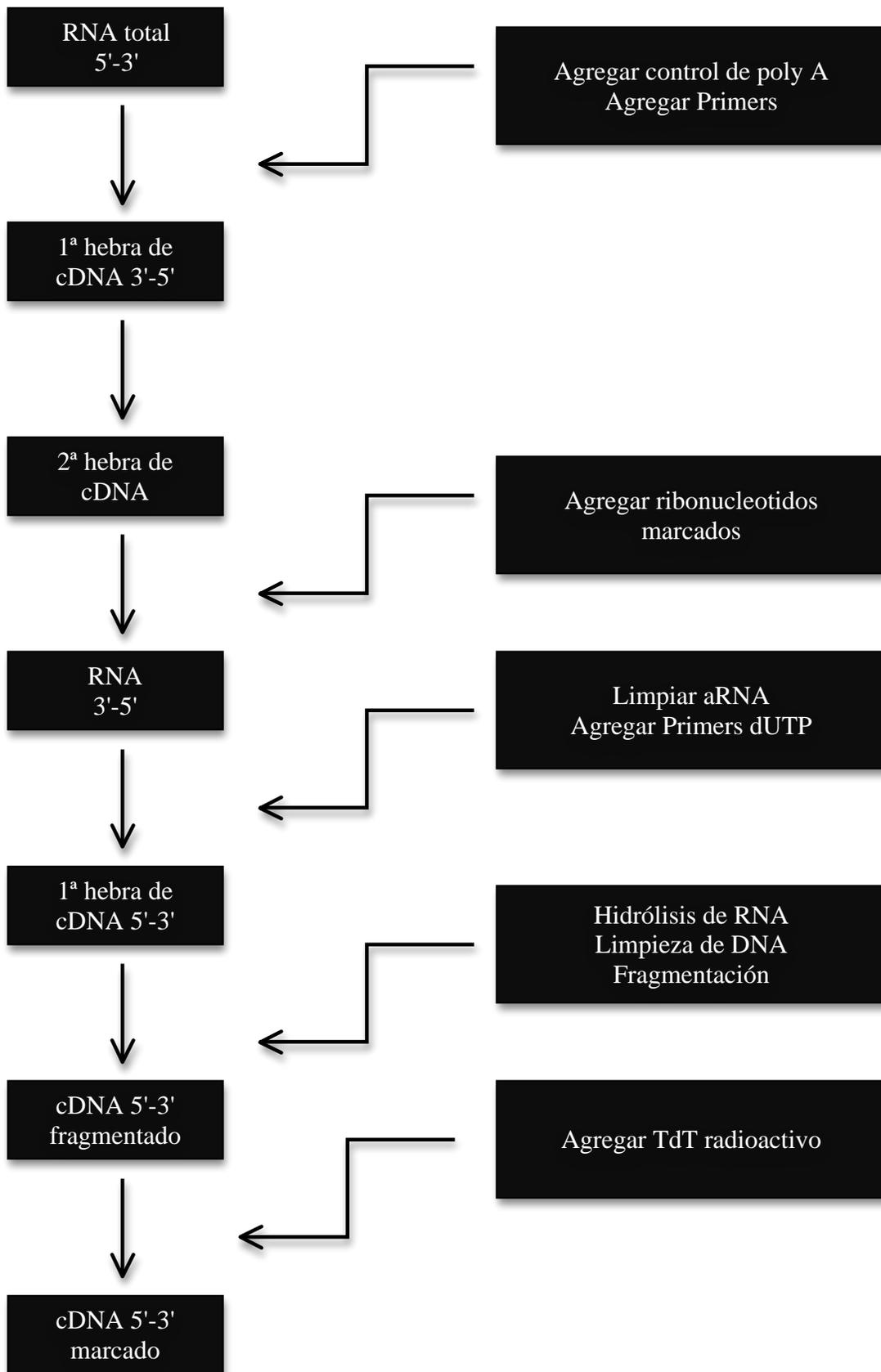


Figura 2: Diagrama de metodología de procesamiento de microarreglos

Análisis de datos

El análisis de datos se hizo por medio del software R (datos del sitio). Para poder realizar el análisis, además de haber instalado R fue necesario descargar los siguientes paquetes complementarios: *affy*, *limma* y *gplots*. Los datos se analizaron bajo la forma de archivos.CEL que contienen información obtenida a partir del procesamiento de microarreglos. El primer paso para poder empezar a trabajar con R fue determinar el escritorio de trabajo, es decir el lugar en el que se encontraban tanto los archivos .CEL como la tabla con la información básica. Una vez determinado el escritorio de trabajo, deben abrirse las librerías de los paquetes que se van a utilizar (*affy*, *limma* y *gplots*) y cargarse los archivos de trabajo.

Para empezar el análisis se realizó un boxplot de la totalidad de los datos crudos, esto con el fin de saber la distribución que tenían y saber si era necesario normalizarlos. Una vez que se constató que era necesario normalizarlos, se optó por la normalización por cuantiles y además se hizo una corrección de fondo por el método “RMA” (*Robust Microarray Average*). Una vez normalizados los datos, se volvió a construir un *boxplot* para comprobar que la normalización fuera exitosa y se creó un archivo en el que se guardaron los datos de expresión normalizada para poder ser utilizados a continuación. A partir de este último archivo, se definieron los grupos de estudio que se querían comparar y se construyeron 3 matrices a partir de las cuales se realizaron los contrastes entre los grupos que se deseaba comparar. Una vez obtenidos los contrastes, se estimaron y se comprimieron las variantes hacia un valor global. A partir de estos últimos análisis, fue posible crear una tabla con los genes diferencialmente expresados en función del logaritmo de cambio conocido como log FC. A continuación, fue necesario cargar la librería correspondiente al chip Human Exon Gene 1.1st, para poder obtener los nombres de los genes que correspondían a cada sonda y poderlos estudiar. Por último, se realizó un mapa de calor para poder visualizar los resultados obtenidos de manera integral.

Resultados

Población estudiada

Se incluyeron 6 individuos originarios de Orizaba, Veracruz con las características que se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Características de los individuos del grupo de estudio

¹ Remoto equivale a contacto cercano con personas con TB, pero sin vivir en el mismo hogar

² La induración se midió en mm, a partir de 10mm se considera positivo

Número de Individuo	Género	Edad	Contacto ¹	Resultado de prueba de IGRA	TST ²	Tiempo
P2	M	41	Remoto	Positivo	14	T0
P2	M	41	Remoto	Positivo	14	T1
P2	M	41	Remoto	Positivo	14	T6
P26	M	30	Remoto	Negativo	10	T0
P26	M	30	Remoto	Negativo	10	T1
P26	M	30	Remoto	Negativo	10	T6
P3	F	63	Remoto	Positivo	13	T0
P3	F	63	Remoto	Positivo	13	T1
P3	F	63	Remoto	Positivo	13	T6
P21	F	64	Remoto	Negativo	10	T0
P21	F	64	Remoto	Negativo	10	T1
P21	F	64	Remoto	Negativo	10	T6
P15	F	48	Remoto	Positivo	13	T0
P15	F	48	Remoto	Positivo	13	T1
P15	F	48	Remoto	Positivo	13	T6
P18	F	55	Remoto	Negativo	14	T0
P18	F	55	Remoto	Negativo	14	T1
P18	F	55	Remoto	Negativo	14	T6

Análisis de datos obtenidos por microarreglos

Los primeros resultados que se obtuvieron en R fueron dos diagramas de caja que permiten visualizar los datos antes y después de haber sido normalizados por el método de cuantiles.

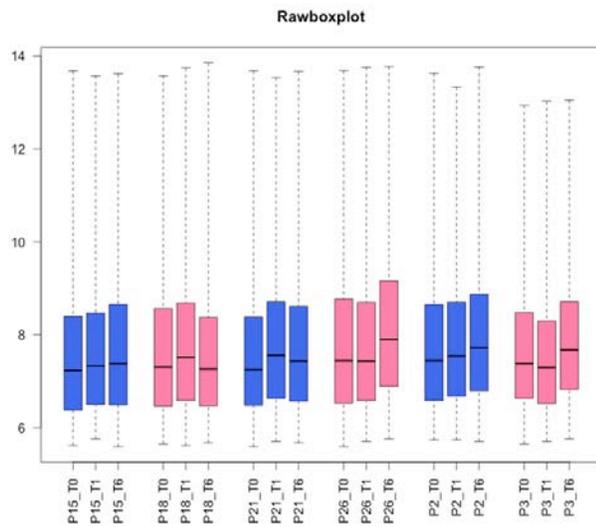


Figura3: Tendencias de los valores de expresión antes de normalizar

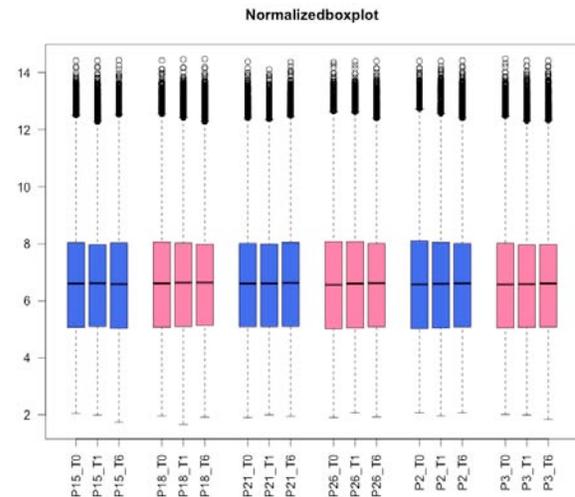


Figura 4: Tendencias de los valores de expresión normalizados por el método de cuantiles

Después de haber normalizado los datos y construir matrices para poder realizar los contrastes que permitieron comparar los dos grupos de individuos (TST+ IGRAS+ vs. TST+ IGRAS-) a lo largo del tiempo (T0, T1 y T6), se obtuvieron tablas con los valores de expresión de cambio de los genes así como sus valores estadísticos de confianza. En las tablas obtenidas, fue posible observar que ningún valor fue significativo y por lo tanto los resultados de este estudio no se pueden considerar como válidos. A partir de las tablas obtenidas, se seleccionaron únicamente los 20 genes que fueron filtrados de acuerdo a su mayor nivel de cambio (log FC).

En la tabla 14, que compara los dos grupos antes de iniciar el tratamiento con isoniazida, se puede observar que los 5 genes con mayor cambio de expresión fueron: *GSTM1*, *TPTE2*, *TMPRSS1E*, *C4BPA* e *IL18RAP*. Las funciones básicas de cada uno de estos genes se describen a continuación.

Tabla 14 Cambios transcriptómicos en el contraste TST+ IGRA+ T0 vs. TST+IGRAS- T0

	Gene	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
7903765	<i>GSTM1</i>	1.4451	7.9836	2.1544	0.0472	0.99995	-4.1477
7970404	<i>TPTE2</i>	-1.4447	4.9140	-1.9704	0.0668	0.99995	-4.2350
8095364	<i>TMPRSS11E</i>	1.3411	5.3532	3.7747	0.0017	0.99995	-3.3891
7909318	<i>C4BPA</i>	-1.1260	5.0231	-1.2448	0.2316	0.99995	-4.5442
8044049	<i>IL18RAP</i>	-1.1008	8.6859	-5.1580	0.0001	0.67751	-2.8843
8119595	<i>RPL7L1</i>	-1.0843	4.5987	-2.7675	0.0140	0.99995	-3.8502
8037298	<i>CD177</i>	0.9673	6.9173	0.7610	0.4580	0.99995	-4.6949
8102998	<i>GYP A</i>	-0.9467	9.6181	-1.6456	0.1199	0.99995	-4.3822
8139125	<i>TARP</i>	0.9459	8.4554	4.0779	0.0009	0.99995	-3.2646
7956937	<i>RAP1B</i>	-0.9365	5.8036	-2.9173	0.0103	0.99995	-3.7781
8125734	<i>DAXX</i>	-0.9327	5.6700	-2.4190	0.0282	0.99995	-4.0196
8118634	<i>RING1</i>	0.9266	5.4454	1.9290	0.0722	0.99995	-4.2543
8065242	<i>LINC00652</i>	-0.9167	5.4628	-1.8827	0.0786	0.99995	-4.2758
8140709	<i>KIAA1324L</i>	-0.9119	6.2400	-2.6983	0.0161	0.99995	-3.8837
8035829	<i>RPL34</i>	-0.9117	9.7230	-1.4481	0.1674	0.99995	-4.4654
7914180	<i>SPCS2</i>	-0.9089	5.0249	-1.0604	0.3051	0.99995	-4.6084
8178917	<i>VPS52</i>	-0.9063	5.6444	-1.7172	0.1057	0.99995	-4.3507
7987145	<i>FMN1</i>	-0.9004	6.5258	-1.7035	0.1083	0.99995	-4.3568
8062927	<i>PI3</i>	0.8954	10.0458	1.6453	0.1199	0.99995	-4.3824
8133688	<i>SNORA14A</i>	-0.8915	7.1051	-2.1913	0.0440	0.99995	-4.1299

GSTM1 (*Glutathione S-Transferase Mu 1*): es un gen que está relacionado a vías metabólicas. Dentro de sus funciones se encuentra la desintoxicación de compuestos electrofílicos como carcinógenos, fármacos, toxinas del medio ambiente y compuestos derivados del estrés oxidativo (GeneCards).

TPTE2 (*Transmembrane Phosphoinositide 3-Phosphatase And Tensin Homolog 2*): es un gen relacionado con el metabolismo de lípidos y proteínas (GeneCards).

TMPRSS11E (*Transmembrane Protease Serine 11E2*): es un gen con actividad de peptidasa y endopeptidasa ligadas a serina. Es una proteasa de serina con actividades gelatinolíticas y caseinolíticas (GeneCards).

C4BPA (*Complement Component 4 Binding Protein Alpha*): este gen se encarga de controlar la vía de la activación del complemento. Su actividad consiste en unirse como cofactor al inhibidor de C3b/C4b que posteriormente hidroliza el fragmento C4b del complemento. También actúa con la proteína anti coagulante S y con el componente P del suero amiloide; las enfermedades asociadas a este gen son la gonorrea y la deficiencia de proteína S. No se han encontrado referencias que determinen una relación directa entre *C4BPA* y la tuberculosis (GeneCards).

IL18RAP (*Interleukin 18 Receptor Accesory Protein*): es una subunidad accesoria que forma parte del receptor heterodimérico de IL18 que es una citocina pro inflamatoria involucrada en la inmunidad celular. Esta proteína, favorece la unión entre IL18 y su receptor . Las mutaciones en este gen se han visto

relacionadas con algunas patologías como la enfermedad de Crohn, lepra y otras enfermedades inflamatorias (GeneCards).

Tabla 15: Cambios transcriptómicos en el contraste TST+ IGRA+ T1 vs. TST+IGRAS- T1

	Gene	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
8035829	<i>RPL34</i>	-1.7949	9.7230	-2.8511	0.0118	0.61996	-2.8722
8109222	<i>RPL7</i>	-1.7208	9.7099	-3.4937	0.0031	0.61996	-2.0632
8151376	<i>RPL7</i>	-1.6570	8.7326	-3.5138	0.0030	0.61996	-2.0382
7970404	<i>TPTE2</i>	1.6205	4.9140	2.2102	0.0424	0.65608	-3.6656
8101126	<i>CXCL10</i>	-1.5836	6.3869	-2.6938	0.0163	0.61996	-3.0705
8037298	<i>CD177</i>	1.4115	6.9173	1.1105	0.2836	0.83726	-4.7872
8098439	<i>EPCAM</i>	-1.3727	3.7612	-6.3731	0.0000	0.33811	0.9097
7990965	<i>RPS17</i>	-1.3433	9.9661	-2.9390	0.0098	0.61996	-2.7610
8180287	<i>RPL31</i>	-1.3048	10.2089	-2.8490	0.0118	0.61996	-2.8749
8116980	<i>RNF182</i>	1.2650	6.7325	1.2296	0.2371	0.81415	-4.6907
7903765	<i>GSTM1</i>	1.2564	7.9836	1.8730	0.0799	0.70158	-4.0551
8027323	<i>ZNF257</i>	-1.2428	5.9059	-3.2496	0.0052	0.61996	-2.3686
7987145	<i>FMN1</i>	-1.1771	6.5258	-2.2269	0.0411	0.65323	-3.6455
8118324	<i>C2</i>	1.1749	4.0908	2.1885	0.0442	0.66067	-3.6914
8118634	<i>RING1</i>	1.1221	5.4454	2.3361	0.0332	0.63488	-3.5137
8091778	<i>SCARNA7</i>	-1.1098	8.5511	-2.4139	0.0285	0.63175	-3.4186
7956937	<i>RAP1B</i>	1.0999	5.8036	3.4263	0.0036	0.61996	-2.1471
8147654	<i>POLR2K</i>	-1.0966	7.9519	-2.6929	0.0163	0.61996	-3.0715
8062927	<i>PI3</i>	1.0895	10.0458	2.0021	0.0630	0.68300	-3.9094
7915910	<i>PDZK1IP1</i>	1.0867	10.4421	2.3629	0.0315	0.63175	-3.4811

En la tabla número 15 de comparación al mes de tratamiento, *RPL34*, *RPL7*, *TPTE2* y *CXCL10* son los genes con mayor cambio de expresión, cuyas funciones básicas se describen a continuación (GeneCards).

RPL34 (Ribosomal Protein L34): es una proteína perteneciente a la subunidad 60S del ribosoma. Una de sus funciones principales es la biosíntesis del precursor de N-glycano, el oligosacárido ligado por lípido al dolicol, y transferir dicho precursor a las proteínas nacientes. Una de las enfermedades relacionadas a este gen es una deficiencia en el MHC clase I (GeneCards).

RPL7 (Ribosomal Protein 7): es una proteína ribosomal contenida en la subunidad 60S. Entre sus funciones se encuentran, la participación en la síntesis de N-glicano y la inhibición de la traducción de mRNA en la célula, lo que sugiere que juega un papel clave en el aparato de traducción. Además se ha demostrado que tiene un efecto de auto antígeno en enfermedades autoinmunes como el Lupus (GeneCards).

CXCL10 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 10): es un gen que codifica para una proteína con características antimicrobianas y que además representa un ligando para *CXCR3*. Al unirse con dicho ligando, ocurre un proceso pleiotrópico que conlleva a la estimulación y la migración de monocitos, células *Natural Killer* y linfocitos T así como a la modulación de la expresión de moléculas de adhesión (GeneCards).

Tabla 16: Cambios transcriptómicos en el contraste TST+ IGRA+ T6 vs. TST+IGRAS- T6

	Gene	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
7903765	<i>GSTM1</i>	1.6772	7.9836	2.5004	0.0240	0.99988	-3.9884
8102998	<i>GYP A</i>	-1.2852	9.6181	-2.2342	0.0405	0.99988	-4.1158
8009380	<i>SNORA38B</i>	-1.0440	8.4332	-0.8479	0.4093	0.99988	-4.6706
7909318	<i>C4BPA</i>	-1.0342	5.0231	-1.1434	0.2701	0.99988	-4.5801
8180245	<i>LOC100505530</i>	-1.0287	5.8506	-1.6735	0.1142	0.99988	-4.3727
8178841	<i>TAP2</i>	1.0248	4.8225	0.8689	0.3981	0.99988	-4.6649
8125537	<i>HLA-DMA</i>	-1.0002	5.9887	-1.9991	0.0634	0.99988	-4.2263
8062927	<i>PI3</i>	0.9990	10.0458	1.8357	0.0856	0.99988	-4.3010
8119595	<i>RPL7L1</i>	-0.9754	4.5987	-2.4896	0.0245	0.99988	-3.9936
8044049	<i>IL18RAP</i>	-0.9421	8.6859	-4.4144	0.0005	0.99988	-3.1575
8139125	<i>TARP</i>	0.9159	8.4554	3.9486	0.0012	0.99988	-3.3357
8035829	<i>RPL34</i>	-0.9031	9.7230	-1.4345	0.1712	0.99988	-4.4721
8118345	<i>CFB</i>	-0.8881	6.2773	-1.9893	0.0645	0.99988	-4.2309
8180405	<i>ARL4A</i>	-0.8805	7.2148	-1.9269	0.0724	0.99988	-4.2596
8125436	<i>HLA-DRB5</i>	0.8793	8.8412	1.3229	0.2049	0.99988	-4.5154
8037298	<i>CD177</i>	0.8774	6.9173	0.6903	0.5002	0.99988	-4.7096
8083260	<i>CPA3</i>	0.8647	7.1559	1.2584	0.2268	0.99988	-4.5394
8020684	<i>HRH4</i>	0.8467	9.0363	1.0408	0.3139	0.99988	-4.6140
7978846	<i>POLE2</i>	-0.8403	6.3718	-2.9443	0.0097	0.99988	-3.7770
7976554	<i>LOC100133207</i>	-0.8398	5.7820	-1.9811	0.0655	0.99988	-4.2347

En la tabla 16 se comparan los diferentes grupos diagnósticos a los 6 meses de tratamiento con INH, lo genes que muestran mayor cambio en sus niveles de expresión son *GSTM1*, *GYP A*, *SNORA38B*, *C4BPA* y *LOC100505530* y *TAP2*, sus funciones básicas se describen a continuación.

GYP A (*Glycophorin A*): Este gen codifica para una sialo glicoproteína de la membrana de los eritrocitos en humanos y es la que lleva los determinantes antigénicos para los grupos sanguíneos MN o Ss. Algunas enfermedades relacionadas con este gen son la malaria y la anemia hemolítica autoinmune, pero no existe ninguna relación con MTB (GeneCards).

SNORA38B (*Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 38B*): es una molécula de RNA que no codifica para ninguna proteína. Pertenece a la clase de snoRNA (GeneCards).

LOC100505530: es una molécula de RNA que no codifica para ninguna proteína, pertenece a la clase ncRNA (GeneCards).

TAP2 (*Transporter 2 ATP Binding Casette, Subfamily B*): se trata de un gen que codifica para una proteína asociada a membrana que pertenece a la superfamilia de transportadores de cassettes de ATP. Este gen en

específico pertenece a la subfamilia MDR/TAP que está asociada con la multidrogo resistencia. Una de las funciones principales de *TAP2* es transportar a los antígenos desde el citoplasma hasta el retículo endoplásmico para que puedan asociarse con el MHC de clase I. También funciona como andamio para el plegamiento del MHC de clase I para que éste pueda unirse al péptido (GeneCards).

CD177: Es un gen que codifica la glicoproteína de superficie celular unida a glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Se puede unir a la molécula-1 de adhesión celular endotelial de plaquetas y de esta manera intervenir en la trans migración de neutrófilos (GeneCards).

Además, a partir de los genes obtenidos se construyó un mapa de calor que representa la expresión génica de los 6 individuos a lo largo del tiempo.

Heatmap of filtered Data

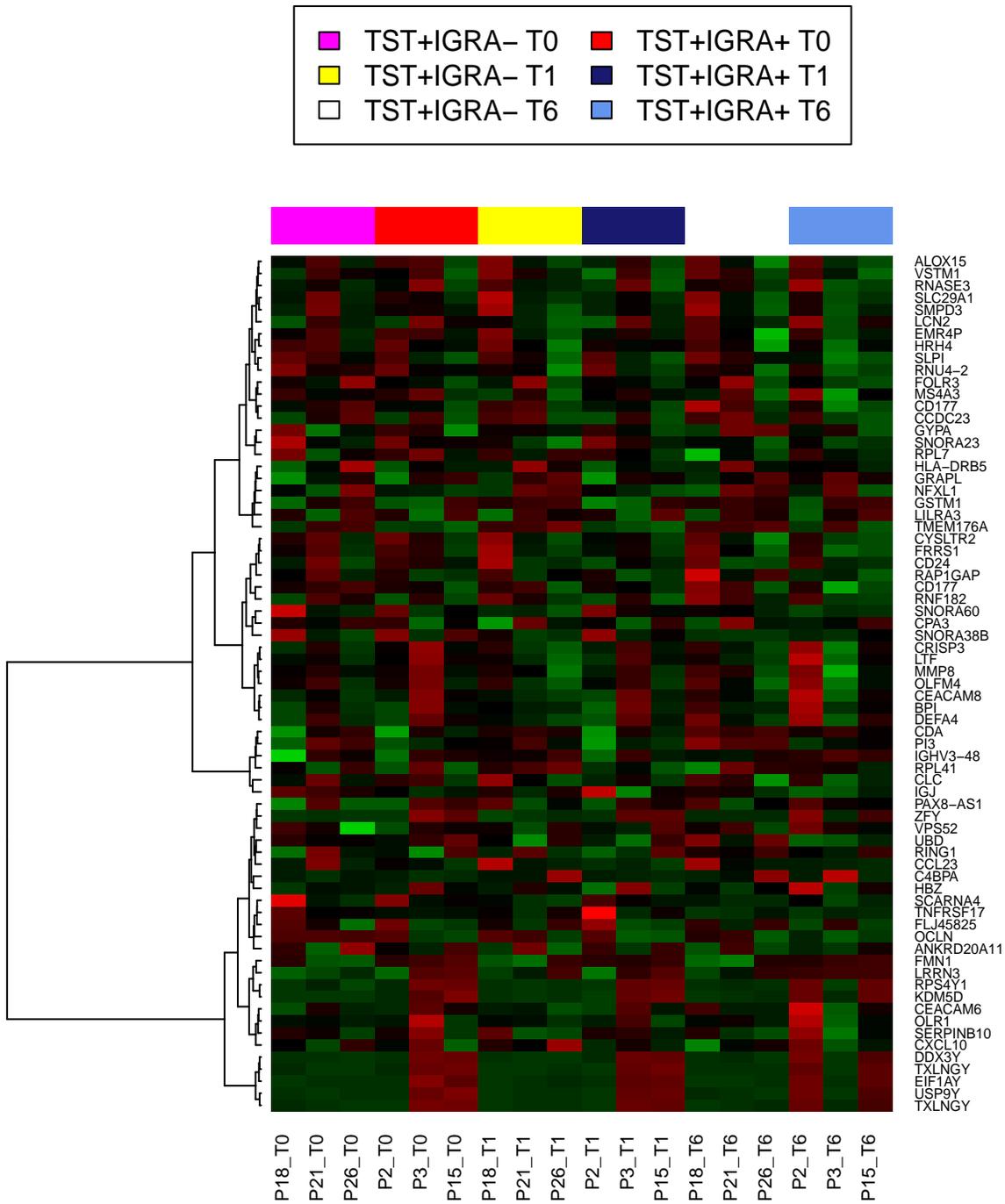


Figura 3: Mapa de calor que representa los patrones de expresión de los genes de los 6 individuos estudiados a lo largo del tiempo de tratamiento (T0, T1 y T6).

Discusión

La mayoría de los estudios realizados sobre este tema se han enfocado en un número limitado de moléculas y han sido *in vitro*, si bien esto pudo permitir un acercamiento importante a los procesos que ocurren *in vivo*, estos estudios siguen teniendo ciertas limitantes. Uno de los estudios realizado por Dyrhol-Riise y colaboradores, que señala que el diagnóstico por la prueba de IGRAS (QTF-TB) es más específico que el de la prueba de TST para identificar a individuos LTB, se enfocó en dar seguimiento al tratamiento por medio de la prueba de QTF-TB. Constató que los individuos que fueron sometidos a 15 meses de tratamiento profiláctico presentaron los mismos resultados que antes del tratamiento. Por lo tanto, la prueba QTF-TB no es un buen método para dar seguimiento al tratamiento y no se puede considerar al IFN- γ como un biomarcador de eficacia del tratamiento (Dyrhol-Riise *et al.* 2010). Como ya se mencionó antes, las pruebas de IGRAS miden la respuesta inmune del hospedero al patógeno, por lo tanto no se pueden relacionar directamente con que el patógeno siga presente en el organismo. Por otra parte, se realizó un estudio a partir de muestras de sangre periférica tomadas a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento profiláctico en individuos LTB y se midió la secreción de IFN-gama *in vitro* tras ser estimulado con diferentes péptidos presentes en la micobacteria. Si bien este estudio no logró determinar algún biomarcador, si comprobó que la secreción de IFN- γ es distinta para cada péptido pero además cambia según la duración del tratamiento profiláctico (0, 1 o 6 meses de tratamiento. Esto abre las puertas hacia nuevas moléculas que constituyen posibles biomarcadores (Torres *et al.* 2015). Lo novedoso de este trabajo es que se optó por un estudio *in vivo* en el cual se analizaron muestras de sangre de individuos LTB a lo largo del tratamiento, por la técnica de microarreglos, de tal manera que se pudo analizar la totalidad del genoma y no sólo un par de moléculas. Esto permite tener un panorama más amplio para poder buscar patrones en la expresión génica de los individuos que puedan brindar información sobre la eficiencia del tratamiento con INH en individuos con LTB.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron a partir de contrastes de expresión génica realizados entre individuos TST+, IGRAS+ vs. TST+, IGRAS- antes de iniciar el tratamiento (T0), después de un mes de tratamiento (T1) y al término del tratamiento, 6 meses después (T6). Dichos resultados no mostraron transcritos con expresión diferencial que fuera estadísticamente significativa, entre ninguno de los grupos estudiados. Esto podría deberse a que el tamaño de la muestra fue muy pequeño como para arrojar resultados significativos. Además, ninguno de los genes obtenidos por el análisis con microarreglos se validó por PCR, de tal forma que no se deben considerar como resultados definitivos. Además, los resultados integrativos de los perfiles de expresión génica representados en el mapa de calor tampoco demostraron ningún patrón entre grupos diagnósticos ni a lo largo del tiempo de tratamiento con INH. Sin embargo, se optó por hacer un análisis bibliográfico de los genes con probable expresión diferencial y su relación con el sistema inmune o la contención de MTB.

A continuación se discuten los genes más relevantes de los tres contrastes, ya sea por su participación en el sistema inmune y la respuesta hacia MTB o por su relación a la ingesta de INH.

GSTM1, se encuentra sobre expresado en TST+ IGRAS+ respecto a TST+ IGRAS-, a lo largo del tiempo (logFC: T0= 1.44, T1=1.25, T6=1.67) Este gen ha sido estudiado en cuanto a su relación con casos de patotoxicidad durante el tratamiento de INH, pues de acuerdo con dos estudios realizados en poblaciones brasileñas, algunos de sus polimorfismos pueden influenciar el metabolismo de INH. (Teixeira *et al.* 2011, Costa *et al.* 2012). El presente trabajo no está enfocado en la hepatotoxicidad, por lo tanto no se estudiaron a detalle los polimorfismos, pero debido a que varios estudios considera a su papel en el metabolismo de INH se considera que las variaciones en sus niveles de expresión podrían depender de la ingesta de INH.

C4BPA, estuvo sube expresado en individuos TST+ IGRAS+ respecto a TST+ IGRAS-, a lo largo del tiempo (logFC: T0=-1.12, T1=-1.03, T6=-1.03). Este gen, está directamente relacionado con el sistema inmune, sus funciones principales se encuentran ligadas a la activación del complemento. Si bien no se han encontrado estudios que lo relacionen con casos de tuberculosis, debería estudiarse su función exacta con el fin de saber si su patrón de expresión puede relacionarse con las respuesta hacia MTB o servir para medir la eficiencia del tratamiento. Por otra parte, el hecho de que esté ligado al sistema inmune y que los individuos IGRAS+ tienen menor expresión que aquéllos que son IGRAS-, es interesante desde el punto de vista de las diferencias entre las pruebas diagnósticas debido a la gran controversia que aún existe respecto a la sensibilidad y especificidad de la prueba de TST. Esta molécula podría servir para caracterizar las diferencias entre individuos correspondientes a diferentes grupos diagnósticos. Por otra parte sugiere una diferencia entre grupos diagnósticos.

IL18RAP es un gen muy relevante para este estudio, pues se ha reportado la importancia de la proteína IL18 así como de sus receptores para actuar contra MTB. Aunque aún no existe información que relacione de manera directa *IL18RAP* con la TB se han encontrado estudios que determinan que el papel de ciertos receptores de IL18 es fundamental al momento de combatir MTB, es posible que esto se encuentre directamente relacionado con *IL18RAP* y nos puede guiar sobre nuevas pistas acerca de la respuesta inmune y el tratamiento contra MTB. En un estudio realizado por Gonzalez-Juarrero y sus colaboradores, se determinó la respuesta inmune hacia MTB así como algunos de sus marcadores moleculares a partir de pulmones de ratones infectados. Algunas de las moléculas inflamatorias que tuvieron cambios importantes en su expresión y se proponen como moléculas biomarcadoras fueron las interleucinas, sin embargo se constató que sus respectivos receptores estuvieron mucho más expresados que las interleucinas mismas. Se menciona un cambio importante en IL-18bp, IL18rap. Además de estos receptores, destacaron otros como

IL-12b, IL-12rb2, esto puede ser de interés ya que como se menciona en el artículo de Robinson (Robinson 2012), IL12 influye de manera indirecta en la expresión de IL18 (Gonzalez-Juarrero *et al.* 2012).

En el 2012 se realizó un estudio que comprobó que la actividad de INF- γ , TNF- α e IL18 eran fundamentales para limitar el crecimiento bacteriano de MTB, además demostró que estas tres citocinas cooperan entre ellas y sinergizan su actividad. Esto coincide con el estudio de Gonzalez-Juarrero en el cual concluye que los genes que tuvieron cambios de expresión más significativos fueron aquéllos relacionados con TNF, INF- γ y señales inflamatorias como IL-18 e IL12 provenientes de quimiocinas y macrófagos entre otros (Gonzalez-Juarrero *et al.* 2012).

Los macrófagos que son el blanco principal de MTB en el pulmón, secretan durante la infección, IL12 e IL27. Se ha visto que IL12 estimulan la producción de INF- γ . Esta interleucina y TNF- α se regulan mutuamente, ambos estimulan la producción de la otra y TNF- α estimula la producción de IL18 que a su vez estimula la de INF- γ . Por otra parte, IL27 es secretada por los macrófagos, como ya se menciono anteriormente, regula de manera negativa a INF- γ , TNF- α e IL18. Otra observación importante a lo largo de este estudio, fue que cuando se neutralizaba IL27 por medio de un receptor soluble, se incrementaba la expresión de la cadena beta del receptor de IL18 (IL-18Rbeta), de manera opuesta, cuando se secreta IL27, se regula de manera negativa la expresión de IL-18Rbeta. A partir de esto, se concluyó que IL-18Rbeta juega un papel importante en el sistema de regulación de las tres citocinas y por lo tanto IL27 también y su inhibición podría aportar cambios favorables durante el tratamiento (Robinson 2012). Si bien esto no aporta información directa sobre IL18RAP, demuestra que los receptores de IL18 pueden jugar un papel clave al momento de combatir la infección.

Por otra parte, se analizaron los polimorfismos SNP (Single Nucleotide Polymorphism) de *IL18R1*, *IL12B* e *IL12RB1* en la población china de origen Han, que es de alta incidencia de MTB. Se observó que ninguno de los polimorfismos por sí solos tienen una relación significativa con la incidencia de MTB. Sin embargo, al estratificar a la población por rangos de edad, se observó que en los mayores de 46 años había una correlación entre la incidencia de MTB y un polimorfismo de *IL18R1*. Se sabe que *IL18R1* codifica para el receptor IL-18R- α que es estimulado por IL12. Al acoplarse con IL-18Rbeta forma un complejo de señalización que activa INF- γ . Todo esto, una vez más confirma lo descrito por Robinson acerca de la dependencia que existe en IL-12, IL-18, INF- γ y TNF- α así como la importancia de los receptores de IL-18 en la respuesta inmune hacia MTB (Zhang *et al.* 2003). Lo anterior, nos puede indicar que el encontrar *IL18RAP* sub expresado puede tener influencia directa sobre la actividad de IL18, una interleucina fundamental durante la respuesta inmune contra MTB. Además, en este estudio se observó que está sub expresada en TST+ IGRAS+ respecto a TST+ IGRAS-, a lo largo del tiempo (logFC: T0=-1.100, T1= -0.942), esto arroja una diferencia más entre individuos pertenecientes a dos grupos diagnósticos diferentes.

RPL34: se observa un decremento en la expresión durante el primer mes de tratamiento y un incremento después de 6 meses de tratamiento (logFC: T0=-0.911, T1=-1.79, T6=-0.903), se sugiere estudiar este gen para saber si su función en el sistema inmune tiene relevancia durante la infección con MTB y si su actividad se ve realmente afectada por la INH o los cambios que se observaron en este estudio son causa de otros factores. Aunque no se conoce hasta ahora una relación directa con MTB, se sabe que una deficiencia de esta proteína ribosomal puede generar trastornos en el MHC de clase I y esa afectación al sistema inmune podría tener repercusiones durante la infección de MTB

CXCL10 (logFC: T1= -1.58). Ambos genes se relacionan con el sistema inmune y una vez más se observa que se encuentran sub-expresados en los individuos IGRAS+, por lo tanto también podrían ser moléculas útiles para estudiar más a fondo las pruebas diagnósticas.

CXCL10 es fundamental para la inmunidad contra MTB, pues contribuye junto con otras a la formación del granuloma. En estudios realizados a partir de lavados de pulmón, se observó que en el fluido de los pulmones de pacientes con TB había altos niveles de CXCL10 además de algunas otras quimiocinas como CCL5, CCL12 y CXCL8. La sobre expresión de las quimiocinas durante la infección con MTB favorece la movilización de células del sistema inmune al sitio de infección, por ejemplo los linfocitos T que son atraídos desde la periferia (Pokkali *et al.* 2009). Se sabe que CXCL10 puede ser producida por monocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos y es estimulada por IFN- γ . Durante la infección con MTB, la concentración más elevada de CXCL10 ocurre en el epitelio bronquial. Pero además se demostró que los macrófagos también estimulan la producción de CXCL10 de manera indirecta y por una vía diferente a la de IFN- γ . Esto ocurre durante la formación del granuloma, pues secretan TNF- α que parece influenciar la producción de CXCL10 (Algood *et al.* 2003). Su expresión en los otros contrastes (T0 y T6) no estuvo dentro de los 20 genes con mayor cambio, por lo tanto no se le dio seguimiento, pero debido a su importancia en casos de MTB sería interesante ver como evolucionan sus perfiles de expresión a lo largo del tratamiento. Además debe destacarse que el gen se encuentra sub expresado en individuos IGRAS+ respecto a IGRAS-.

TAP2 ya ha sido estudiado en casos de tuberculosis, Se han realizado diversos estudios sobre los polimorfismos de *TAP1* y *TAP2* y su posible influencia en la susceptibilidad a infecciones por MTB. El primero de estos estudios se realizó en 1997 por Rajalingam y colaboradores y se enfocó en determinar si los genes TAP estaban involucrados en la patogénesis de tuberculosis pulmonar y lepra tuberculoide en pacientes del norte de la India. Este estudio concluyó que *TAP2* y más específicamente los alelos A/F pueden influir la susceptibilidad de un paciente de sufrir una infección con MTB. Los autores ponen en evidencia que tras haber realizado una corrección del valor p para el número de alelos estudiados, dicho

valor ya no fue significativo, sin embargo, consideran que existe una relación entre los polimorfismos de *TAP2* y la susceptibilidad de los individuos de contraer la infección por la micobacteria (Rajalingam et al. 1997). En el año 2006 se publicó otro estudio que analizaba nuevamente los polimorfismos de *TAP2*, entre otros, y su relación con la susceptibilidad a tuberculosis. En este estudio, se determinó que en una población colombiana, cuando se tenía un haplotipo *TAP1* 0101-*TAP2* 0101, el alelo 0101 se encontraba menos presente en los casos de tuberculosis, en el caso de *TAP* las proporciones eran las siguientes: 57.4% en individuos infectados y 68.6% en controles, pero de manera similar al estudio pasado, tras realizar la corrección de Bonferroni, el valor p ya no fue significativo. Por otra parte se observó nuevamente una tendencia de susceptibilidad a tuberculosis cuando estaba presente el alelo *TAP2* 0201, esto es consistente con el estudio de Rajalingam, pero una vez más el valor p no es significativo. No obstante, el hecho de que se observe esta tendencia ha llevado a pensar que el papel de *TAP2* corresponde a la selección de un péptido muy específico de la micobacteria (Gomez *et al.* 2006). Las observaciones de estos dos estudios, a pesar de no poder ser concluyentes debido a la no significancia del valor p, sugieren que aún falta más por estudiar y el gen *TAP2* podría ser de importancia para comprender mejor la infección por MTB.

El perfil de expresión de *CD177* (logFC: T0=0.966, T1=1.411, T6= 0.87) es el único que se encuentra sobre-expresado en individuos IGRAS+ y se observa una disminución entre la expresión antes del tratamiento y al finalizar el tratamiento. Por su relación con el sistema inmune se considera pertinente profundizar los estudios sobre este gen para saber si juega un papel en la respuesta hacia MTB y si su actividad durante dicha respuesta puede modificarse por el tratamiento con INH.

De manera general, los perfiles de expresión del contraste entre TST+, IGRAS+ vs. PPD+, IGRAS- al tiempo 0 demuestran que en los individuos positivos para ambas pruebas diagnósticas hay una sub-expresión de algunos genes relevantes al sistema inmune. Esta condición se mantiene durante el tratamiento con INH y se puede observar al T1 y al T6.

Por otra parte, se analizaron los genes que se expresan en más de un contraste. Los genes compartidos por los contrastes durante todo el tratamiento (T0, T1 y T6) permiten saber si existen procesos comunes a diferentes grupos o diferencias en la expresión de un mismo gen a lo largo del tratamiento. Los genes comunes a los contrastes realizados en los tiempos T0 y T1 nos indican similitudes o diferencias en los procesos que ocurren como parte de la respuesta al tratamiento a corto plazo. Los genes en común entre los contrastes al tiempo T0 y al T6 nos permiten ver los efectos del tratamiento a largo plazo.

En cuanto a los genes comunes a los 3 contrastes realizados a lo largo del tiempo (T0, T1 y T6), están *GSTM1*, *CD177*, *RPL34* y *PI3*. De estos 4 genes, el único que no se había discutido anteriormente es *PI3*.

PI3 (Peptidase Inhibitor 3): Este gen codifica para un inhibidor específico de elastasa que funciona como péptido antimicrobial contra bacterias gram positivas y negativas así como contra patógenos fungales. La expresión de este gen puede verse sobre-regulada por lipopolisacáridos y por citocinas activadas por bacterias. Se encuentra sobre-expresado en los individuos IGRAS+ respecto a aquéllos IGRAS- ($T_0=0.89$, $T_1=1.089$, $T_6=0.99$). Debido a su función como péptido antimicrobial el observar una mayor expresión en un grupo diagnóstico en relación al, nos podría llevar a pensar que sí existen diferencias entre individuos PPD+ IGRAS+ y PPD+ IGRAS-. Por otra parte, se considera que el estudio de este gen podría revelar si su expresión se ve afectada por la carga o actividad bacteriana. Se sabe que este gen también está regulado por lipopolisacáridos (LPS), MTB no tiene LPS sino lipoarabinoma (LAM), pero ambos son glicolípidos y están constituidos por lipoglicanos. Es necesario determinar si LAM tiene efectos similares al LPS sobre este gen porque entonces, podría relacionarse con la infección por MTB.

Los genes compartidos por los tiempos T_0 y T_1 son: de *TPTE2* y *RAP1B*, *RING1* y *FMNI*. No se ha podido establecer ninguna relación clara entre los cambios de estos genes y la infección con MTB o el tratamiento con INH debido a que *RAP1B* se encarga de procesos celulares como crecimiento y diferenciación, *TPTE2* del metabolismo de lípidos, *RING1 (Ring Finger Protein 1)* se caracteriza por codificar proteínas que tienen un motivo RING que se puede unir al zinc y por lo tanto a los dedos de zinc. Además, este gen puede unirse al DNA y actuar como represor transcripcional (GeneCards). *FMNI (Formin1)*, está asociado con vías de señalización para adhesión celular mediada por caderinas (GeneCards).

Los genes compartidos al T_0 y al T_6 fueron: *C4BPA*, *IL18RAP*, *RPL7L1* y *TARP*. Los dos primeros se discutieron anteriormente.

RPL7L1 (Ribosomal Protein L7 Like1), es una proteína involucrada en procesos de traducción citoplasmática (GeneCards). Por lo tanto no se considera relevante para este estudio.

TARP (TCR Gamma Alternate Reading Protein), es un gen relacionado con las vías de señalización del MHC Clase I y presentación de antígeno. En cierto tipo de tejido no linfóide, cuando el receptor gamma de los linfocitos T no se reacomoda entonces se expresa este locus en el cual el transcrito contiene un subconjunto de segmentos de genes de TRC (GeneCards). Este gen se encuentra sobre expresado en IGRAS+ respecto a IGRAS- ($\log_{2}FC$: $T_0=0.945$, $T_6=0.915$), y demuestra que existen diferencias entre diferentes grupos diagnósticos. El estudio de este gen podría permitir comprender si participa en la respuesta a MTB y si responde al tratamiento con INH.

Conclusión

A partir de los resultados obtenidos, a pesar de no ser significativos, se constató que existen diferencias entre grupos diagnósticos (TST+ IGRAS+ vs. TST+ IGRAS-) en genes relevantes al sistema inmune y contención de MTB.

Se proponen 4 moléculas para ser estudiadas con el fin de determinar si sus patrones de expresión pueden relacionarse a la respuesta inmune hacia MTB y al efecto del tratamiento profiláctico con INH: GSTM1, IL18RAP y CXCL10 y PI3. Por último, cabe mencionar que podría ser de utilidad estudiar los genes *C4BPA* y *TARP* debido a sus funciones en el sistema inmune.

Cabe resaltar que los resultados de este proyecto no tuvieron significancia estadística, por lo tanto para futuros estudios debería considerarse un mayor tamaño de muestra además de un grupo control y la validación los resultados por PCR.

Referencias

- Agilent Technologies (2008). One platform - endless possibilities for DNA, RNA, protein and cell analysis. Technical report.
- Algood, H. M. S., Chan, J., y Flynn, J. L. (2003). Chemokines and tuberculosis. *Cytokine & Growth Factor Rev*, 14(6), 467–477
- Alvarez, G. G., Van Dyk, D. D., Davies, N., Aaron, S. D., Cameron, D. W., Desjardins, M., Mallick, R., Obed, N., y Baikie, M. (2014). The Feasibility of the Interferon Gamma Release Assay and Predictors of Discordance with the Tuberculin Skin Test for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in a Remote Aboriginal Community. *PLoS ONE*, 9(11):e111986.
- Costa, G. N. O., Magno, L. a V, Santana, C. V. N., Konstantinovas, C., Saito, S. T., Machado, M., Rios-Santos, F. (2012). Genetic interaction between NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2E1, and environmental factors is associated with adverse reactions to anti-tuberculosis drugs. *Mol Diag Ther*, 16(4), 241–50.
- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Resp Med*, 100(11):1862–1870.
- de Souza, F. M., do Prado, T. N., Pinheiro, J. D. S., Peres, R. L., Lacerda, T. C., Loureiro, R. B., Carvalho, J. A., Fregona, G., Dias, E. S., Cosme, L. B., Rodrigues, R. R., Riley, L. W., and Maciel, E. L. N. (2014). Comparison of Interferon- γ Release Assay to Two Cut-Off Points of Tuberculin Skin Test to Detect Latent Mycobacterium tuberculosis Infection in Primary Health Care Workers. *PLoS ONE*, 9(8):e102773.
- Doherty, M., Wallis, R. S., and Zumla, A. (2009). Biomarkers for tuberculosis disease status and diagnosis. *Curr Opin Pulm Med*, 15(3):181–187.

- Dyrhol-Riise, A. M., Gran, G., Wentzel-Larsen, T., Blomberg, B., Haanshuus, C. G., y Mørkve, O. (2010). Diagnosis and follow-up of treatment of latent tuberculosis; the utility of the QuantiFERON-TB Gold In-tube assay in outpatients from a tuberculosis low-endemic country. *BMC Infect Dis*, *10*, 57. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-10-57>
- Gomez, J. E. y McKinney, J. D. (2004). M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis*, *84*(1-2):29–44.
- Gomez, L. M., Camargo, J. F., Castiblanco, J., Ruiz-Narváez, E. a., Cadena, J., & Anaya, J. M. (2006). Analysis of IL1B, TAP1, TAP2 and IKBL polymorphisms on susceptibility to tuberculosis. *Tissue Antigens*, *67*(4), 290–296.
- Gonzalez-Juarrero, M., Kingry, L. C., Ordway, D. J., Henao-tamayo, M., Harton, M., Basaraba, R. J., ... Slayden, R. A. (2009). Immune Response to Mycobacterium tuberculosis and Identification of Molecular Markers of Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *40*, 398–409.
- Huebner, R. E., Schein, M. F., and Bass Jr., J. B. (1993). The Tuberculin Skin Test. *Clin Infect Dis*, *17*(6):968–975.
- Jang, J. Y., Park, I. W., Choi, B. W., y Choi, J. C. (2014). The Usefulness of the Tuberculosis Skin Test and the Interferon-gamma Release Assay in the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in South Korea. *Osong Public Health and Res Perspect*, *5*:S18–S23.
- Kaufmann, S. H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*, *1*(1):20–30.
- Kleinert, S., Tony, H.-P., Krueger, K., Detert, J., Mielke, F., Rockwitz, K., Schwenke, R., Burmester, G. R., Diel, R., Feuchtenberger, M., y Kneitz, C. (2012). Screening for latent tuberculosis infection: performance of tuberculin skin test and interferon- release assays under real-life conditions. *Ann Rheum Dis*, *71*(11):1791–1795.
- Mack, U., Migliori, G. B., Sester, M., Rieder, H. L., Ehlers, S., Goletti, D., Bossink, a., Magdorf, K., Holscher, C., Kampmann, B., Arend, S. M., Detjen, a., Bothamley, G., Zellweger, J. P., Milburn, H., Diel, R., Ravn, P., Cobelens, F., Cardona, P. J., Kan, B., Solovic, I., Duarte, R., Cirillo, D. M., y Lange, C. (2009). LTBI: Latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J*, *33*(5):956–973.
- Maertzdorf, J., Weiner III, J., and Kaufmann, S. H. E. (2012). Enabling biomarkers for tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis*, *16*(9):1140–1148.

- Mueller, O. y Schroeder, A. (2004). RNA Integrity Number (RIN) Standardization of RNA Quality Control Application. *Nano*, pages 1–8.
- Palmer, M. y Prediger, E. (2003). Assessing RNA quality. Technical report, Ambion. The RNA Company, Woodward, TX, USA.
- Pan American Health Organization. (2014). Tuberculosis in the Americas.
- PreAnalytiX GmbH (2009). PAXgene Blood RNA Kit Handbook. Technical report, Qiagen GmbH.
- Pokkali, S., y Das, S. D. (2009). Augmented chemokine levels and chemokine receptor expression on immune cells during pulmonary tuberculosis. *Hum Immunol*, 70(2), 110–5.
- Rajalingam, R., Singal, D. P., y Mehra, N. K. (1997). Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis . *Tissue Antigens* , 49 (0001-2815), 168–172.
- Richeldi, L. (2006). An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(7):736–742.
- Robinson, C. M., Jung, J.-Y., y Nau, G. J. (2012). Interferon- γ , tumor necrosis factor, and interleukin-18 cooperate to control growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Cytokine*, 60(1), 233–241.
- Secretaría de Salud (2008). Estándares para la atención de la tuberculosis en México. Technical report.
- Teixeira, R. L. D. F., Morato, R. G., Cabello, P. H., Muniz, L. M. K., Moreira, A. D. S. R., Kritski, A. L., ... Santos, A. R. (2011). Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(6), 716–724.
- Torres, M., Garcia-Garcia, L., Cruz-Hervert, P., Guio, H., Carranza, C., Ferreyra-Reyes, L., ... Wilkinson, R. J. (2015). Effect of isoniazid on antigen-specific interferon-secretion in latent tuberculosis. *Eur Respir J*, 45(2), 473–482.
- World Health Organization (2014). Global tuberculosis report 2014 (WHO/HTM/TB/2014.08). Technical report.
- World Health Organization (2015). Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. Technical report.

Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., Zhang, H., y Sun, Z. (2003). Mode of action of pyrazinamide: Disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*, 52(5):790–795.