

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD SEDE CENTRO

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENETICO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (-308) Y BETA (SITIO DE RESTRICCION DE NCO1 EN EL PRIMER INTRON) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR SIN RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A :

DRA. MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES



TUTOR: DR. CESAR R. GONZALEZ BONILLA.
ASESOR: DRA. GUADALUPE DE LOS ANGELES GARCIA ELORRIAGA
NUMERO DE REGISTRO DEL PROYECTO: 2001-693-009

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2005

m347600



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



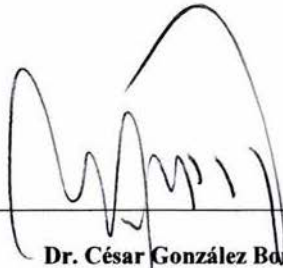
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

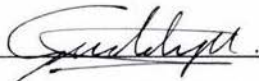


Dr. César González Bonilla

Tutor

Jefe de la Unidad de Investigación Médica
en Inmunología e Infectología.

U. M. A. E. Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández".
Centro Médico Nacional "La Raza".
IMSS.

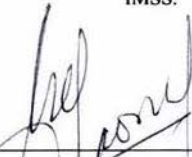


Dra. Guadalupe De Los Ángeles García Elorriaga

Asesor

Investigador Asociado Unidad de Investigación Médica
en Inmunología e Infectología.

U. M. A. E. Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández".
Centro Médico Nacional "La Raza".
IMSS.




Dra. Verónica Alejandra Gaona Flores

Coordinador Clínico de educación e investigación en Salud de la

U. M. A. E. Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández".

Centro Médico Nacional "La Raza".
IMSS.



Dra. Ma. Guadalupe Carrillo Montes

Alumna

Médico Patólogo Clínico

Adscrito al Departamento Clínico del

Banco Central de Sangre

Centro Médico Nacional "La Raza".

IMSS.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: M. Guadalupe Camillo

FECHA: 07 09 05

FIRMA: 

Investigadores Principales

Alumna: Dra. Ma. Guadalupe Carrillo Montes

Médico Patólogo Clínico
Adscrito al Departamento Clínico del
Banco Central de Sangre
Centro Médico Nacional “La Raza”.
IMSS.

Tutor: Dr. César R. González Bonilla.

Jefe de la Unidad de Investigación Médica
en Inmunología e Infectología.
U. M .A. E. “Dr. Daniel Méndez Hernández”.
Centro Médico Nacional “La Raza”.
IMSS.

Asesor: Dra. Guadalupe de los Ángeles García Elorriaga

Investigador Asociado
Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.
U. M .A. E. “Dr. Daniel Méndez Hernández”.
Centro Médico Nacional “La Raza”.
IMSS.

Investigadores Asociados:

Dr. Samuel Elías Uribe Márquez

Coordinador Delegacional de salud comunitaria.
3er. Piso, Edificio de la Consulta Externa
Centro Médico Nacional “La Raza”
IMSS.

Dr. Daniel Rodríguez Parga.

Neumólogo Adscrito a la U. M .A. E. de Infectología
“Dr. Daniel Méndez Hernández”
Centro Médico Nacional “La Raza”.
IMSS.

QBP. Melby Dessiré Mendoza Aguilar

Alumna de Maestría.
Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.
U. M .A. E. “Dr. Daniel Méndez Hernández”.
Centro Médico Nacional “La Raza”.
IMSS.

Lugar donde se realizó el estudio:

1. **Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología** U. M. A. E. de Infectología “DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ”.
2. **Consulta Externa del Servicio de Neumología** de la U. M. A. E del Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” “CMNR”.
3. **U. M. A. E de Infectología** “Dr. Daniel Méndez Hernández” CMNR
4. **Unidades de Medicina familiar** Delegación 2, 3, y 4 del D. F. IMSS

Financiamiento.

Para la realización del proyecto se contó con el apoyo financiero de la coordinación de Investigación en Salud **FOFOI** en el 2001 con clave 09-B5-61-2800/2435.

El **CONACYT** apoyó además la realización de éste proyecto con una beca/crédito con clave de asignación **169801**. En el periodo comprendido de marzo del 2002 a febrero del 2004.

La alumna recibió una beca como Residente de Investigación del **INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL** de marzo del 2002 a febrero del 2004.

Agradecimientos.

Mi agradecimiento a todas aquellas personas que apoyaron desinteresadamente la realización de éste proyecto: pacientes, enfermeras, médicos, estudiantes y químicos. En especial a:

Dr. Eloy Sardó Alabazares de la UMF 6.
Dra. Noemí Muciño Campuzano de la UMF 43.
Dra. Marina C. Marín Pavón. UMF 05.
Dra. Lilia Gordón Neumología del HGCMNR.
Dr. Felipe González Investigador Asociado de UIMI CMNR.
M en C. Alicia Ocaña investigador UIMI CMNR.
Dra. Julieta Luna Inmunobioquímica del Instituto Politécnico Nacional.
Dra. Araceli Sánchez Hernández UMF 120.
Dra. Ana Julia de la Vega Trujillo UMF 35.
Enf. Ma. de Jesús Lazcano UMF 14 TM.
Enf. Felipa Cruz de Isidro UMF 14 TV.
Dra. Guadalupe Millán Romero UMF 94
Dra. Magdalena Luna Abascal UMF 34.
Dra. Ma. Guadalupe Castellanos Medina UMF 03.
Dra. Patricia Rosales HGZ 1A.
Dra. Ma Esther Gómez Carrillo HGZ 1A.
Enf. Ma Esther Aguilar UMF 05.
Dr. Raúl Amador López Laboratorio Clínico UMF 06.
Quím. José Amparo Magaña Laboratorio Clínico U. M. A. E. Dr. GGG CMNR.
Quím. Victoria Pérez Olea Laboratorio Urgencias U. M. A. E. Dr. GGG CMNR.
Quím. Carmen Alaéz Inmunogenética INDRE IPN.
Dra. Clara Gorodezky Inmunogenética INDRE IPN.
Dra. Araceli Malagón Martínez Jefe de Enseñanza BCS CMNR.

El orden no indica importancia o preferencia alguna necesariamente ya que para mi todos ellos fueron importantes y sin su ayuda éste trabajo no se habría realizado.

Dedicatoria.

A Kevin Alejandro

RESUMEN

Antecedentes: La tuberculosis es considerada la principal causa de muerte causada por una sola bacteria en el mundo. Según cálculos de la Organización Mundial de la salud (OMS) un tercio de la población Mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y por tanto está en riesgo de desarrollar la enfermedad. Cada año aparecen aproximadamente 10 millones de nuevos casos y tres millones mueren por dicha causa. El TNF juega un papel clave en la orquestación de eventos implicados en inflamación e inmunidad de la enfermedad. El gen que lo codifica, es un gen polimórfico. El genotipo TNF B2 se asocia a niveles incrementados de TNF α circulantes. La presencia del alelo TNFA2 está asociado con gravedad en varios procesos inflamatorios crónicos. Los estudios disponibles sobre polimorfismos del TNF en la tuberculosis son escasos y no concluyentes.

Objetivo: Comparar la frecuencia de los polimorfismos genéticos del TNF α (-308) Y β (sitio de restricción de NcoI en el primer intrón) en pacientes con tuberculosis pulmonar sin y con respuesta al tratamiento.

Métodos: Se realizó un estudio observacional, transversal, comparativo, ambilectivo.

Se estudiaron cuatro grupos: 1.-Pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar **sin** respuesta al tratamiento. 2.- Pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar **con** respuesta al tratamiento. 3.-Pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus y 4.-Sanos.

A los pacientes e les aplicó una entrevista con la finalidad de establecer su evolución clínica. Posteriormente se tomó una muestra de sangre periférica para identificación de los genotipos TNFA2 y TNFB2 por PCR (polymerase chain reaction) y su posterior digestión con la enzima de restricción NcoI. El análisis de los resultados se realizó mediante X^2 de independencia con un nivel de significancia de 0.05, OR y 95% de intervalos de confianza.

Resultados: Se estudiaron 186 sujetos en total: 42 del grupo 1 y 48 en cada uno del resto de los grupos. No se encontró diferencia significativa en la frecuencia de los alelos, ni los genotipos de TNF alfa (-308) entre los pacientes con tuberculosis con y sin respuesta al tratamiento.

La distribución del alelo del TNF β (B2) entre los grupos de pacientes con tuberculosis sin y con respuesta al tratamiento presentó una significancia estadística de $p < 0.05$ con un OR de 2.52 con IC del 95% de 3-43 para el grupo sin respuesta al tratamiento y un OR de 0.62 para el grupo con respuesta al tratamiento con un IC del 95% de -10 a 30. En relación a los sanos se encontró una diferencia significativa: $p < 0.05$ (OR de 0.36 con IC -95%- de 8-30). Por su parte el alelo B1 tuvo una frecuencia mayor en el grupo de pacientes con tuberculosis sin respuesta al tratamiento $p < 0.05$ (OR de 2.7 con IC -95%- de 9-29) en relación a los sanos.

Conclusiones: La frecuencia del polimorfismo de TNF α (-308) parece no estar relacionado con la respuesta al tratamiento en la tuberculosis pulmonar.

El TNF β (Alelo B2) fue más frecuente en el grupo de pacientes con respuesta al tratamiento y sanos, pudiendo estar relacionado con protección a la enfermedad.

El alelo del TNF β B1 parece estar relacionado con susceptibilidad a la tuberculosis.

Palabras Clave: Tuberculosis pulmonar, respuesta al tratamiento, polimorfismo Factor de necrosis tumoral, alelos y genotipos.

ABSTRACT

Background: The tuberculosis (TB) is considered the main cause of death caused by single bacteria in the world. According to calculations of the World Health Organization of (WHO) a third of the World population is infected with Mycobacterium tuberculosis (Mb tb), and therefore it is in risk of developing the disease. Every year they appear approximately 10 millions of new cases and three millions people die for this cause.

The TNF plays a key role in the orchestration of complex events implied in inflammation and immunity of the disease. The gene that codifies it, is a polymorphic gene. The genotype TNF B2 (polymorphic) is associated to increased levels of circulating TNF α . The presence of the polymorphism of TNFA (A2) is associated with graveness in several chronic inflammatory processes. The available studies on polymorphisms of the TNF in the tuberculosis are scarce and not conclusive.

Objective: To compare the frequency of the genetic polymorphisms of the TNF α (-308) and β (site of restriction of Nco1 in the first intron) in patients with pulmonary tuberculosis without response to the treatment and patients with pulmonary tuberculosis with response to the treatment.

Methods: An observational, traverse and comparative study was carried out. Four groups were studied: 1. Patients with diagnosis of pulmonary tuberculosis without response to the treatment. 2. Patients with diagnosis of pulmonary tuberculosis with answer to the treatment. 3. Patient with diabetes mellitus diagnosis and 4. Healthy subjects. An interview was applied to the patients with the purpose of establishing their clinical evolution. Later we took a peripheral blood sample for identification of the polymorphic genotypes TNFA2 and TNFB2 for PCR (polymerase chain reaction) and its later digestion with the restriction enzyme Nco1. The analysis of the results was carried out by X2 of independence with a level of significance of 0.05, OR and 95% of confidence intervals.

Results: 186 subjects studied altogether: 42 of the group 1 and 48 in each one of the rest of the groups. With not significant difference in the frequency of the polymorphic allele of TNF alpha (-308) among the four groups. Nor in the frequency of the genotypes among the two groups of patient with tuberculosis to be a difference statistically significant among these two groups.

The distribution of the polymorphic allele of the TNF beta (B2) among the groups 1 and 2 (patients with tuberculosis with and without response to the treatment) it did not have statistical significance but in relation to the healthy ones was a significant difference: $p < 0.05$ (OR 0.36 with IC -95% - of 8-30). On the other hand the non polymorphic allele (B1) had a greater frequency in the group of tuberculosis patients' $p < 0.05$ (OR 2.7 with IC -95% - of 9-29) in relation to the healthy ones. With respect to the genotypes beta among the group 1 and 2 we found a significant difference with great number of B2B2 in the group control (2) as well as of B1B1, and one greater frequency of the B1B2 in the group of patients (1) $p < 0.05$ (OR 2.52 for the group 1 with an IC of 95% of 3-43)

Conclusions: The frequency of the polymorphism of TNF alpha (-308) seems not to be related with the response to the treatment in the pulmonary tuberculosis.

The TNF beta (allele B2) was more frequent in the control group and healthy, being able to be related with protection to the illness. And the TNF allele beta without polymorphism (B1) seems to be related with susceptibility to the tuberculosis.

Keywords: Pulmonary Tuberculosis, Treatment Response, Polymorphism, Tumoral Necrosis, Alleles and Genotypes.

INDICE

PÁGINA

Marco Teórico	1
Justificación	8
Pregunta de Investigación	8
Objetivo	9
Hipótesis	9
Variables	10
Material y Métodos	16
Tipo de Estudio	16
Universo de Trabajo	16
Criterios de Selección	16
Metodología	17
Consideraciones Éticas	22
Tamaño de la Muestra	22
Análisis estadístico	23
Resultados	24
Discusión	29
Conclusiones	33
Cuadros y gráficas de resultados	35
Bibliografía	47
Hoja de recolección de datos. (Anexo 1)	55
Hoja de consentimiento informado (Anexo 2)	56

MARCO TEÓRICO.

La tuberculosis es considerada la principal causa de muerte por una sola bacteria en el mundo. Según cálculos de la Organización Mundial de la salud (OMS) un tercio de la población Mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo causante de la tuberculosis y por tanto está en riesgo de desarrollar la enfermedad. Cada año aparecen aproximadamente 8 millones de nuevos casos y 2.2 millones mueren por dicha causa. Las estadísticas actuales estiman que entre los años 2000 y 2020, se infectarán aproximadamente mil millones de personas, de estas, 200 millones desarrollaran enfermedad activa y 35 millones morirán por ésta causa (1, 2, 3, 4).

Desde la celebración del Día Mundial contra la Tuberculosis, se ha hecho conciencia de la evidente reemergencia de esta enfermedad, de la necesidad de aceptar que se puede curar y prevenir así como de la corresponsabilidad general para lograr una de las metas de la OMS: Curar el 85% de los casos nuevos diagnosticados por baciloscopia de esputo positiva, y reconocer al 70% de los casos existentes (5).

En México el riesgo de infección o enfermedad, de acuerdo a la OMS es relativamente uniforme en la población, en el orden de un 0.5%. Los casos nuevos registrados en el año 2000 fueron 15,853 con un total de casos de aproximadamente 40,000 según la OMS y la Dirección General de Epidemiología/SSA. Los estados con mayor incidencia son Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Baja California, Guerrero y el Estado de México, a los cuales corresponde aproximadamente el 50% de todos los casos (1, 6,7).

El instituto Nacional de enfermedades respiratorias reportó a la tuberculosis como la sexta causa de morbilidad hospitalaria en el 2002. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) reporta que existieron 10,000 casos nuevos en el 2004 en México. Distribuidos en su mayoría en las zonas pobres del país, así como un aumento en la incidencia de 0.4 % por año (7).

A pesar de que la enfermedad puede atacar cualquier parte del organismo, el sitio más afectado son los pulmones (> 90%). Para luchar en contra de la tuberculosis resulta necesaria la detección temprana de casos nuevos con tuberculosis activa, a fin de tratarlos oportunamente con fármacos antituberculosis indicados de manera efectiva; lo cual disminuye el riesgo de morir por esta enfermedad, y al mismo tiempo, bloquea la

transmisión a otras personas en el ambiente familiar, laboral, y en la comunidad (6). Se estima que una sola persona con enfermedad activa sin tratamiento puede infectar entre 10 y 15 personas en un año (4).

El tratamiento de la tuberculosis activa implica tomar múltiples drogas diariamente, al menos durante seis meses. En todo el mundo a partir de 1995 se han venido presentando cambios dramáticos en la incidencia y epidemiología de ésta enfermedad, sobre todo en los grupos de alto riesgo. Asimismo, la situación se ha complicado aún más con la creciente aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes, las cuales se han atribuido a la prescripción inadecuada o por falta de adherencia al tratamiento. Desde esta perspectiva, todo lo anterior constituye un nuevo y grave problema de salud pública, que compromete seriamente la infraestructura disponible en los servicios de salud para afrontarlo (6, 8,9).

Debido a ésta situación la OMS estableció varios criterios de clasificación de los pacientes que presentan algún tipo de resistencia, con la finalidad de facilitar el uso de las guías de tratamiento elaboradas para el manejo adecuado del paciente con tuberculosis, estos criterios se definen como:

Drogorresistencia: A la eliminación de bacilos vivos resistentes a uno o más fármacos contra la tuberculosis.

Falta de respuesta al tratamiento: Son aquellos pacientes que después de 5 meses de tratamiento ó después de haber completado su esquema de 8 meses continúan eliminando bacilos vivos.

Caso Crónico: Es aquel paciente que presenta falla al esquema recomendado por la OMS estando bajo la observación de un trabajador de la salud, el caso crónico ha recibido dos o más de dos esquemas de tratamiento, completo o incompleto, y puede ser bacilífero o no. (10, 11).

En la fisiopatología de la tuberculosis pulmonar interaccionan múltiples factores desde los ya mencionados hasta la susceptibilidad intrínseca del hospedero. Una vez que *Mycobacterium tuberculosis* llega a los alvéolos, por inhalación, inicia la infección de los macrófagos alveolares, multiplicándose libremente en su interior produciendo lisis celular y la infección de nuevas células monocíticas atraídas al lugar de la infección (lesión primaria de Ghon) alcanzando rápidamente un hábitat intracelular.

El control de la infección depende fundamentalmente de la inmunidad celular, mediada principalmente por linfocitos TCD4+, que inducen mecanismos de hipersensibilidad tipo IV.

La respuesta inmune humoral produce anticuerpos cuya utilidad no se ha demostrado, y la celular desempeña un papel fundamental en la curación ya que puede impedir la multiplicación de la micobacteria en la lesión primaria con un granuloma (aproximadamente 90 %), en caso contrario se produce una progresión local o general. Algunos gérmenes permanecen vivos dentro de los macrófagos, aproximadamente en el 10% de los casos, hasta que el paciente presenta una situación que comprometa al sistema inmune, entonces *Mycobacterium* prolifera produciendo una estimulación sostenida de citocinas entre ellas, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), aumentando también los linfocitos citotóxicos y las células NK (natural killer); las células endoteliales periféricas a los granulomas contribuyen a la producción de TNF α e IFN γ . La resistencia o susceptibilidad ante la infección micobacteriana, así como el cuadro clínico dependen del tipo y cantidad de citocinas que se producen. Esta reacción desempeña un papel protector del hospedero contra la micobacteria (13).

El IFN γ contribuye a la respuesta protectora activando a los macrófagos, la IL $_12$ y IL-18 son producidas por estos macrófagos y favorecen el desarrollo de células Th1, la producción de estas citocinas no solo favorece la formación del granuloma y la eliminación de la micobacteria, sino que también puede coadyuvar a la necrosis local y a los efectos sistémicos junto con la liberación de TNF α a la circulación. La infección con cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* induce la secreción de niveles significativamente altos de TNF α correlacionado con la capacidad de desarrollarse intracelularmente, evadiendo la respuesta defensiva de la célula, convirtiéndose en la causa principal de los síntomas de la enfermedad (14,15).

El TNF juega un papel clave en la orquestación de eventos complejos implicados en inflamación e inmunidad. Es producido principalmente por macrófagos activados, células T, células NK, y mastocitos activados, y se sintetiza inicialmente como una glucoproteína transmembranal, no glucosilada de aproximadamente 25 Kd (proteína tipo II), mediante corte proteolítico se ensambla como un homotrímero de 51 Kd, con subunidades de 17 Kd cada una, la acción del TNF se pone en marcha tras la unión del trímero soluble a los

receptores de superficie de las células: TNFR1 y TNFR2. TNF α y TNF β se enlazan a los mismos receptores y evocan respuestas biológicas tanto similares como diversas, sin embargo los polimorfismos genéticos del TNF que se han estudiado hasta el momento se relacionan con producción elevada de TNF α por lo que sólo nos referiremos a esta variante. Las funciones de ésta citocina varían dependiendo de la cantidad producida: en concentraciones bajas (menos de 15 picogramos por ml) actúa a nivel de inflamación local, pero esta misma concentración producida de manera crónica, da lugar a remodelación tisular, induciendo depósito de tejido conectivo (granuloma); en niveles moderados actúa como pirógeno endógeno, estimulando la producción de IL-1 e IL-6; y en la respuesta de fase aguda, altera el equilibrio pro-coagulante y anticoagulante del endotelio vascular, induciendo linfopenia en la inmunodeficiencia. La producción continua de cantidades moderadas de manera crónica induce el estado de caquexia, cantidades altas (más de 1×10^7 por ml) de TNF produce colapso circulatorio, coagulación intravascular diseminada e hipoglucemia grave (16,17).

En la patogénesis de la tuberculosis está bien establecido que la causa de la enfermedad es la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* vivo en los tejidos del paciente, sin embargo en cuanto a la progresión y cronicidad del cuadro clínico estudios recientes han mostrado que la relación entre los factores de virulencia de la micobacteria y los factores del hospedero (edad, estado inmune, malnutrición, enfermedades concomitantes y los factores genéticos) son los responsables de la progresión y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (1, 17).

Existen evidencias que sugieren la participación de algunos genes implicados en la susceptibilidad o en la protección a la progresión de la tuberculosis en el humano. Las regiones del genoma donde pueden localizarse algunos de ellos y que se ven implicadas en la susceptibilidad a la enfermedad son: la región clase II y III del Complejo Principal de Histocompatibilidad, la región 2q33-q37, la región 17p11.2-q25 y la región 12q13-14, donde se han encontrado mutaciones asociadas con cuadros graves de tuberculosis, en los receptores de IL-12, IFN γ , vitamina D y en los genes NRAMP-1, MCP-1, IL-10, IL-1, HLA (el alelo que específicamente se ha asociado con la susceptibilidad a tuberculosis es el HLA-DR2) y TNF α y β que se codifican dentro de estas regiones. Los genes del TNF α parecen tener un papel controversial en la patogénesis de la enfermedad (1, 18, 19).

El gen que codifica para el TNF α y β se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en la región clase III del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), a 250 Kb centroméricas del locus del HLA-B y 850 Kb teloméricas del HLA-DR. Es un gen polimórfico, lo que significa: la presencia de 2 o más alelos de cualquier sistema en una población en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente y cuya frecuencia es superior al 1% (20).

El gen del TNF alfa presenta varios polimorfismos identificados hasta ahora: El -308, -238, -1030, -862, -856, -375, -243, y el + 70. La mayoría se localizan en la zona del promotor del gen. Las variantes alélicas estudiadas se deben a la sustitución de una guanina (alelo A1) por adenina (alelo A2). A los productos de éstos genes polimórficos se les considera activadores transcripcionales, produciendo una elevada cantidad de TNF α en los sujetos que los presentan (18, 20,21). Para el gen del TNF β se estudió el sitio de restricción de NcoI en el primer intrón, el cual también se ha asociado a producción incrementada de TNF alfa por mecanismos aún no esclarecidos (18, 21).

Los genotipos que se obtendrán para TNF α : homocigotos A1A1, homocigotos A2A2 y heterocigotos A1A2; lo mismo para TNF β : homocigotos B1B1, homocigotos B2B2 y heterocigotos B1B2. El genotipo TNF B2B2 y el A2A2 se asocian a niveles incrementados de TNF α circulantes (pacientes hiperproductores de TNF). La frecuencia del alelo TNFA1 se estima en 84% y el alelo TNFA2 en 16%. La frecuencia del alelo TNFB1 se estima en 35% y la del alelo TNFB2 en 65%. (18, 22,23).

El análisis de los polimorfismos del TNF ha sido estimulado a últimas fechas por los numerosos estudios en relación a enfermedades humanas, donde se trata de demostrar un posible papel funcional, la mayoría de los estudios se concentran en enfermedades auto inmunes, inflamatorias, infecciosas y virales (24). Como se muestra en los siguientes estudios realizados: la presencia del polimorfismo de TNF α está asociado con gravedad de varios **procesos inflamatorios crónicos**: Los niños gambianos quienes son homocigotos para el alelo TNFA2 tienen un riesgo relativo de 7.7 para morir o tener secuelas neurológicas severas de malaria cerebral (25). En una población venezolana de portadores heterocigotos de TNF (A1A2) tienen un riesgo relativo de 3.5 para leishmaniasis muco cutánea (26).

En enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) los homocigotos para el alelo A2 tienen mayor grado de obstrucción de las vías aéreas y mal pronóstico en la evolución (27). En un grupo de mujeres afroamericanas con ruptura prematura de membranas fetales, la presencia del alelo A2 se asoció con prematuridad (23).

En 78 pacientes de Camboya con el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, la frecuencia del TNFA2 en los pacientes fue de 7.0% y en los controles 8.3%, reportado como resultado secundario no asociado a susceptibilidad a tuberculosis pulmonar. Concluyendo que el HLA-DQB1*0503 es el alelo relevante en la susceptibilidad de ésta población, y se sugiere realizar más estudios en cuanto a la distribución de los alelos del TNF α ya que no se detectaron diferencias significativas (18,28).

En sepsis postraumática grave y con niveles séricos incrementados de TNF α , el polimorfismo del TNFB (alelo B2) presenta la forma más grave de enfermedad y muerte (22). En sarcoidosis el alelo TNFB1 se encontró que está asociado a curso clínico prolongado (29). Los monocitos de donadores estimulados por LPS *in vitro* quienes son homocigotos para el alelo TNFB2 secretan mayores cantidades de TNF α cuando se compararon con individuos heterocigotos y homocigotos para el alelo TNFB1 (30).

Estos polimorfismos en el TNF se asocian con mayor expresión génica lo cual se traduce como la presencia de niveles circulantes elevados de TNF α . Cifras elevadas de ésta citocina han sido documentadas en enfermedades autoinmunes como: psoriasis (31) y pemphigus vulgaris (32) con lupus eritematoso sistémico (33) y esclerosis sistémica (34). Y en enfermedades infecciosas especialmente por Gram negativos como: enfermedad meningocócica (35), Tracoma (36), lepra lepromatosa (37), amiloidosis grave (38), mediastinitis (39), sinusitis crónica (40), sepsis severa y falla orgánica múltiple (22,41); además, la sepsis se acompaña de TNF circulante detectable en el 25% de los casos y la mortalidad es dos veces mayor comparada con pacientes TNF negativos (42). En algunas de estas enfermedades ya se han identificado polimorfismos. En la tuberculosis, se han encontrado niveles séricos superiores a 335 pg/ml (normal 0 a 15 pg/ml) en formas graves de la enfermedad, indicando gravedad y mal pronóstico (43, 44, 45, 46, 47, 48).

Baena y cols. (49) señalan que la frecuencia de los diferentes polimorfismos del TNF α están influenciados por antecedentes étnicos, y no por distribución aleatoria de los

mismos, mostrando patrones étnico-específicos relacionados con susceptibilidad a una gran variedad de enfermedades.

Delgado y cols (18) compararon los resultados de varios estudios realizados sobre polimorfismos de TNF α en poblaciones de Camboya y de la India, mientras en la población de Camboya no se encontró relación entre el polimorfismo y la tuberculosis pulmonar, en la población de la India se asocia con susceptibilidad a la enfermedad.

Los estudios disponibles sobre polimorfismos del TNF en ésta enfermedad son escasos y no concluyentes, reportando resultados controversiales dependiendo de la población estudiada (1, 18,19). Bayley y cols (24) señalan que los resultados de los diferentes estudios realizados hasta el momento son contradictorios, pero donde parecen ser más consistentes es en el caso de enfermedades infecciosas donde pueden alterar la respuesta inmune y conferir susceptibilidad (50).

Otra enfermedad relacionada con aspectos genéticos es la diabetes mellitus, la cual tiene una prevalencia elevada en nuestro país. Sanchez-Castillo y cols (51) reportan una frecuencia de 9.7% en mujeres obesas y de 5.6 en hombres obesos la cual menciona es mas alta comparada con grupos similares de poblaciones blancas no hispánicas. Madero y Cols (52) por su parte reportan una prevalencia de 13.2% en la población general sin diferencia significativa entre los habitantes de la zona rural y la urbana. Ambos mencionan que es importante conocer todos los factores implicados en la fisiopatología y desarrollo de la enfermedad. En relación a los polimorfismos del TNF, existen controversias de la participación de éstos genes con el desarrollo de diabetes mellitus tanto para TNF α (53, 54) como para TNF β (55, 56).

Por lo que incluimos un grupo de estudio de estos pacientes como control, debido a la alta asociación de la diabetes mellitus con la tuberculosis.

Por todo lo anterior, en el presente estudio se pretende identificar la frecuencia de los polimorfismos genéticos del TNF (para TNF α la posición -308 del promotor y para TNF β el sitio de restricción de NcoI en el primer intrón) en los pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento y con respuesta al tratamiento.

JUSTIFICACIÓN.

Las características clínicas de la tuberculosis se deben a una interacción hospedero micobacteria, donde el papel de los factores genéticos del hospedero no están bien definidos (57). Además existe controversia del papel que juegan los polimorfismos genéticos del TNF en la patogénesis de la tuberculosis así como una limitada información al respecto (1, 18, 19,49).

En el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” y en la consulta externa del servicio de Neumología del Centro Médico Nacional “La Raza” se cuenta con una clínica de tuberculosis, a la cual se ingresaron el año 2001 cincuenta y cinco pacientes sin respuesta al tratamiento; las consecuencias de esta situación (costo del tratamiento, incapacidad laboral, infecto-contagiosidad, etc.) demanda medidas para identificar los posibles factores implicados.

Ya que el TNF α es una citocina clave con funciones reguladoras importantes en inmunomodulación, choque séptico e inflamación crónica en diversas enfermedades, cuyos valores séricos se han encontrado elevados en casos de tuberculosis (43-48) y cuyo gen codificante (TNF α ó β) se ha considerado implicado en la patogénesis de la enfermedad. Consideramos importante evaluar la frecuencia de los polimorfismos genéticos del TNF α y β en los pacientes con tuberculosis pulmonar con y sin respuesta al tratamiento

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿La frecuencia del polimorfismo genético del TNF α (-308) y β (sitio de restricción de NcoI en el primer intrón) se encuentra aumentada en los pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento en relación a los pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento?

OBJETIVOS

General:

Comparar la frecuencia de los polimorfismos genéticos del TNF α (-308) y β (sitio de restricción en el primer intrón) en pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento y pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento.

Específicos:

1. Amplificar mediante la técnica de PCR los segmentos de DNA específicos, donde se localizan las secuencias de interés.
2. Identificar mediante el uso de enzimas de restricción los diferentes alelos y genotipos tanto de TNF α y TNF β en pacientes con tuberculosis pulmonar TBP sin y con respuesta al tratamiento.

HIPÓTESIS.

La frecuencia de los polimorfismos del TNF α (-308) y β (sitio de restricción del primer intrón) está aumentada un 25% en los pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento, en relación a los pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento.

VARIABLES DE ESTUDIO:

POLIMORFISMO GENÉTICO DEL GEN DE TNF α (-308)

Alelo A1

Definición conceptual: Presencia del alelo TNFA1 (G) dentro de la región promotora en la posición -308 del gen para TNF α contiene Guanina (**NO hay sustitución por adenina**).

Definición operacional: Los fragmentos de DNA genómico se amplificaron por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para TNF α obteniendo una banda de 107 pares de bases que incluye el sitio -308.

La variante genética de cada paciente se determinó después de la digestión con *NcoI* del producto amplificado y de electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio. Se determinó la presencia del alelo A1 mediante la fragmentación de la banda original en bandas de 87 y 20 pares de bases.

Indicadores: Presencia/ausencia de las bandas de 87 y 20 pares de bases indicadoras del alelo A1.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Alelo A2

Definición conceptual: Presencia del alelo TNFA2 (A) dentro de la región promotora en la posición -308 del gen para TNF α . **Contiene una sustitución de Guanina por Adenina.**

Definición operacional: Los fragmentos de DNA genómico se amplificaron por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para TNF α obteniendo una banda de 107 pares de bases que incluye el sitio -308.

La variante genética de cada paciente se determinó después de la digestión con *NcoI* del producto amplificado y electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio. Se determinó la presencia del alelo A2 mediante la NO fragmentación de la banda original (Persistencia de la banda de 107 pares de bases).

Indicadores: Presencia/ausencia de la banda de 107 pares de bases indicadora del alelo A2.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Genotipos del TNF α

Definición conceptual. Constitución génica de un locus en particular

Definición operacional. Combinación de los diferentes alelos de TNF α obtenidos por PCR y NcoI en un mismo sujeto, que se obtuvieron a partir del número y del tamaño de las bandas de DNA digerido por NcoI, en el gel de agarosa.

Homocigoto para A1: formado por el alelo A1 en las dos cadenas constitutivas del DNA, con presencia de dos bandas una de 87 y otra de 20 pares de bases en el gel de agarosa.

Heterocigoto: formado por el alelo A1 en una de las cadenas del DNA y por un alelo A2 en la otra cadena del DNA, con presencia de tres bandas de 107, 87 y 20 pares de bases en el gel de agarosa.

Homocigoto para A2: formado por el alelo A2 en las dos cadenas constitutivas del DNA, con presencia de una banda de 107 pares de bases en el gel de agarosa.

Indicadores: Homocigoto A1A1. Heterocigoto A1A2. Homocigoto A2A2

Escala de medición: Nominal

POLIMORFISMO GENÉTICO DEL GEN DE TNF β (SITIO DE RESTRICCIÓN DE NCOI EN EL PRIMER INTRÓN)

Alelo B1

Definición conceptual: Presencia del alelo TNFB1 (G) dentro del sitio de restricción de NcoI en el primer intrón del TNF β . Contiene Guanina (NO hay sustitución por Adenina).

Definición operacional: Los fragmentos de DNA genómico se amplificaron por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para TNF β obteniendo una banda de 782 pares de bases que incluye el sitio de corte de NcoI.

La variante genética de cada paciente se determinó después de la digestión con NcoI del producto amplificado y de electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio. Se determinó la presencia del alelo B1 mediante la fragmentación de la banda original en bandas de 586 y 196 pares de bases.

Indicadores: Presencia/ausencia de las bandas de 586 y 196 pares de bases indicadoras del alelo B1.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Alelo B2

Definición conceptual: Presencia del alelo TNFB2 dentro del sitio de restricción de NcoI en el primer intrón del TNF β . Contiene una sustitución de Guanina por Adenina.

Definición operacional: Los fragmentos de DNA genómico se amplificaron por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para TNF α obteniendo una banda de 782 pares de bases que incluye el sitio de corte de NcoI.

La variante genética de cada paciente se determinó después de la digestión con *NcoI* del producto amplificado y electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio. Se determinó la presencia del alelo B2 mediante la NO fragmentación de la banda original (Persistencia de la banda de 782 pares de bases).

Indicadores: Presencia/ausencia de la banda de 782 pares de bases indicadora del alelo B2.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Genotipos del TNF β .

Definición conceptual. Constitución génica de un locus en particular

Definición operacional. Combinación de los diferentes alelos de TNF β obtenidos por PCR y NcoI en un mismo sujeto, que se obtuvieron a partir del número y del tamaño de las bandas de DNA digerido por NcoI, en el gel de agarosa.

Homocigoto para B1: formado por el alelo A1 en las dos cadenas constitutivas del DNA, con presencia de dos bandas una de 586 y otra de 196 pares de bases en el gel de agarosa.

Heterocigoto: formado por un alelo B1 en una de las cadenas del DNA y por un alelo B2 en la otra cadena del DNA, con presencia de tres bandas de 782, 586 y 196 pares de bases en el gel de agarosa.

Homocigoto para B2: formado por el alelo A2 en las dos cadenas constitutivas del DNA, con presencia de una banda de 782 pares de bases en el gel de agarosa.

Indicadores: Homocigoto B1B1. Heterocigoto B1B2. Homocigoto B2B2

Escala de medición: Nominal

TUBERCULOSIS PULMONAR.

Tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento.

Definición conceptual. Es aquel paciente con diagnóstico de tuberculosis pulmonar (comprobada por baciloscopia y/o cultivo) que presenta baciloscopia positiva al cuarto mes de tratamiento recomendado por la OMS, o con dos baciloscopías positivas de meses consecutivos después de un periodo de negativización y con datos clínicos sugestivos de enfermedad estando bajo la observación de un trabajador de la salud (58).

Definición operacional. Pacientes que acudan a la consulta externa de neumología o a la Clínica de tuberculosis, que tengan diagnóstico de tuberculosis pulmonar corroborado por baciloscopia/cultivo, con más de 5 meses de evolución con baciloscopia y /o cultivo positivo y que hayan recibido uno o más de un esquema de tratamiento recomendado por la OMS.

Indicadores: Respuesta o no respuesta al tratamiento.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento.

Definición conceptual. Pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar corroborado por baciloscopia y /o cultivo, los cuales presentaron una respuesta adecuada al primer esquema de tratamiento recomendado por la OMS (11).

Definición operacional. Aquellos Pacientes que acudan a su Unidad de Medicina Familiar en los cuales hayan presentado negativización de las baciloscopías y / o cultivos dentro de los cinco meses de iniciado el primer esquema de tratamiento recomendado por la OMS.

Indicadores: Respuesta o no respuesta al tratamiento

Escala de medición: Nominal categórica.

Tiempo de evolución de la enfermedad.

Definición conceptual. Tiempo desde el cual se realizó el diagnóstico de tuberculosis pulmonar mediante las pruebas necesarias.

Definición operacional. Tiempo en años y meses desde el cual se realizó el diagnóstico de tuberculosis pulmonar hasta el momento de la entrevista o la curación.

Indicadores: Meses transcurridos desde el diagnóstico inicial.

Escala de medición: Cuantitativa discreta.

Esquemas de tratamiento

Definición conceptual. Esquema de tratamiento recomendado por la OMS contra la tuberculosis prescrito por un profesional de la salud, en base a un diagnóstico clínico, radiológico y / o de laboratorio de la enfermedad.

Definición operacional. Número de esquemas de tratamiento recibidos por un paciente con diagnóstico de tuberculosis, prescrito por un médico.

Indicadores: Número de esquemas recibidos desde el diagnóstico de la enfermedad.

Escala de medición. Cuantitativa discreta

Utilización de TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado)

Definición conceptual. Tratamiento acortado estrictamente supervisado incluye los siguientes fármacos: isoniácida, rifampicina, estreptomycin y etambutol. Se instituye a todo caso nuevo que nunca ha recibido tratamiento y al que reanuda posterior al primer abandono. Se debe administrar durante 25 semanas, hasta completar 105 dosis, dividido en dos etapas: fase intensiva, 60 dosis (diario de lunes a sábado y fase de sostén, 45 dosis (intermitente, 3 veces a la semana) con fármacos en combinación fija y etambutol. Debe ser estrictamente supervisado, manteniendo la combinación fija de fármacos. El personal de salud debe vigilar la administración y deglución regular del tratamiento (58).

Definición operacional. Tratamiento de 6 meses contra la tuberculosis que cubre los requisitos antes mencionados y donde el paciente acude diariamente (o cada tercer día) a su Unidad de Medicina Familiar por la dosis del día, hasta la curación o el cambio de esquema por el médico tratante.

Indicadores: Asignación o no de TAES

Escala de medición: Nominal dicotómica

Drogoresistencia

Definición conceptual. Eliminación de bacilos vivos resistentes a uno o más fármacos antituberculosis.

Definición operacional. Aquellos pacientes que en el último cultivo positivo se les realizó estudios de droga sensibilidad a fármacos contra la tuberculosis y que hayan sido reportados con alguna resistencia.

Indicadores: Resistencia o no resistencia a fármacos contra la tuberculosis.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Edad.

Definición conceptual. Periodo de tiempo transcurrido entre el nacimiento y la inclusión al estudio.

Definición operacional. Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la aplicación de la entrevista y la toma de la muestra.

Indicadores: Años cumplidos

Escala de medición: Cuantitativa discreta.

Género.

Definición conceptual. Clasificación de hombre o mujer (masculino o femenino) por características anatómicas y fenotípicas (59).

Definición operacional. De acuerdo a la información obtenida del expediente clínico y por las características fenotípicas de cada paciente, se clasificó como perteneciente al género masculino o femenino.

Indicadores: Masculino ó femenino.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

MATERIAL Y METODOS

TIPO DE ESTUDIO.

Observacional, transversal, comparativo, ambilectivo.

UNIVERSO DE TRABAJO

Después de que el estudio se aprobó por el Comité Local de Ética y de firmarse el consentimiento informado (Anexo 2) por el paciente, realizamos un estudio transversal comparativo. Se admitieron por muestreo consecutivo continuo 42 pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento que acudieron a la Consulta Externa de Neumología o a la Clínica de Tuberculosis del HICMNR, 48 pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento y 48 sujetos con diabetes mellitus que acudieron a su Unidad de Medicina Familiar en la Delegación 2, 3 y 4 del DF, así como 48 sujetos aparentemente sanos que cumplieron los requisitos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para la Disposición de sangre Humana y sus Componentes, seleccionados en el Banco Central de Sangre del CMNR (60).

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Pacientes que tengan diagnóstico de tuberculosis pulmonar corroborado por baciloscopia/ cultivo, con más de 5 meses de evolución que hayan recibido más de un esquema de tratamiento recomendado por la OMS.
- Pacientes que hayan presentado negativización del las baciloscopías / cultivos dentro de los cinco meses de iniciado el primer esquema de tratamiento recomendado por la OMS (11).

- Adultos de más de 18 años.
- Sexo masculino o femenino.
- Sujetos sanos aceptados como donadores de sangre y sus derivados por el Banco Central de Sangre del CMNR (60).
- Que acepten participar en el estudio con firma de la carta de consentimiento informado (Anexo 2).

Criterios de exclusión:

- Pacientes con infección crónica diferente de tuberculosis.
- Pacientes con diagnóstico de infección por VIH.
- Pacientes con enfermedad auto inmune en el momento del ingreso al estudio.

METODOLOGÍA

De Marzo del 2002 a diciembre del 2004 se realizó un estudio transversal comparativo, donde se estudiaron 186 sujetos divididos en 4 grupos:

El grupo 1 con 42 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmada por baciloscopía y/o cultivo cuya característica principal fue el hecho de no haber presentado baciloscopías y / cultivos negativos a los 5 meses de haber iniciado el tratamiento, tanto el tratamiento acortado estrictamente supervisado de 6 meses, como el tradicional de 8 meses (tratamiento similar al TAES pero cuyas diferencias radican en la toma diaria sin la supervisión del personal de salud y su duración de 2 meses más). Considerándose como *el grupo sin respuesta al tratamiento*.

El grupo 2 con 48 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmada por baciloscopía y / o cultivo los cuales a los 5 meses de tratamiento (TAES o Tradicional) presentaron negativización de sus baciloscopías y / o cultivos. Considerándose *como el grupo con respuesta al tratamiento*.

El grupo 3 incluyó 48 pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus confirmada por pruebas de laboratorio y en tratamiento, que acudieron a su control glucémico mensual.

Considerándose como *el grupo de diabéticos*.

En el grupo de sanos se incluyeron 48 sujetos aparentemente sanos, que aprobaron el proceso de selección establecido por la Norma Oficial Mexicana para la donación de sangre y sus Componentes (60). Considerándose como *el grupo de sanos*.

Todos los sujetos incluidos fueron mayores de edad, sin enfermedades autoinmunes, HIV-, sin infecciones crónicas diferentes de tuberculosis al momento del ingreso al estudio.

La selección de pacientes se llevó a cabo con la colaboración del servicio de Neumología (Consulta Externa) del Hospital General Gaudencio González Garza, El hospital de Infectología y de las Unidades de Medicina Familiar de las delegaciones 2, 3 y 4 del DF. La selección de sujetos sanos se llevó a cabo en el Banco Central de Sangre, y las pruebas de Laboratorio se realizaron en la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología, todos del Centro Médico Nacional "La Raza".

A todos los pacientes del grupo *sin respuesta al tratamiento y con respuesta al tratamiento se les realizó una entrevista* para recabar información acerca de datos generales del paciente, familiares con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, presencia de diabetes mellitus conjuntamente con tuberculosis y tiempo de evolución de la misma. Tiempo de evolución del diagnóstico de tuberculosis a la fecha de inclusión al estudio, esquemas completos de tratamiento recibidos, tiempo efectivo de tratamiento contra tuberculosis, presencia de recaídas, si el paciente ha recibido TAES o tratamiento tradicional de 8 meses, resultado del último cultivo y o baciloscopía y estudios de drogorresistencia.

Se realizó además una **carta de consentimiento informado la cual fue firmada previamente** ya que la prueba a realizarse no formaba parte de su batería de estudios para tuberculosis pulmonar.

A los sujetos del resto de los grupos no se les aplicó carta de consentimiento informado ya que las muestras estudiadas fueron las mismas que se les tomaron para las pruebas de rutina (*el grupo de diabéticos*) y para el procedimiento de donación de sangre (*grupo de sanos*). Tampoco se les aplicó entrevista. A todos los sujetos de estudio de los 4 grupos se tomó una muestra de 5cc de sangre periférica en tubo Vacutainer^(MR) con EDTA como

anticoagulante. Todas las muestras obtenidas se procesaron dentro de las siguientes 24 hrs. por el método de cloruro de magnesio al 5 mM (MgCl) el cual causa lisis celular de eritrocitos y nos permite recuperar una gran cantidad de células nucleadas (61).

Método de MgCl:

Se vacía la sangre total del tubo con EDTA en un tubo falcon de 50ml, se agrega 25 ml de solución de MgCl al 5 milimolar, se agita manualmente, se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decanta se agrega de nuevo MgCl al 5 mM 25 ml, se resuspende el botón de células con suavidad se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decanta y se resuspende en 1 ml de MgCl. Y se procede a la extracción de DNA.

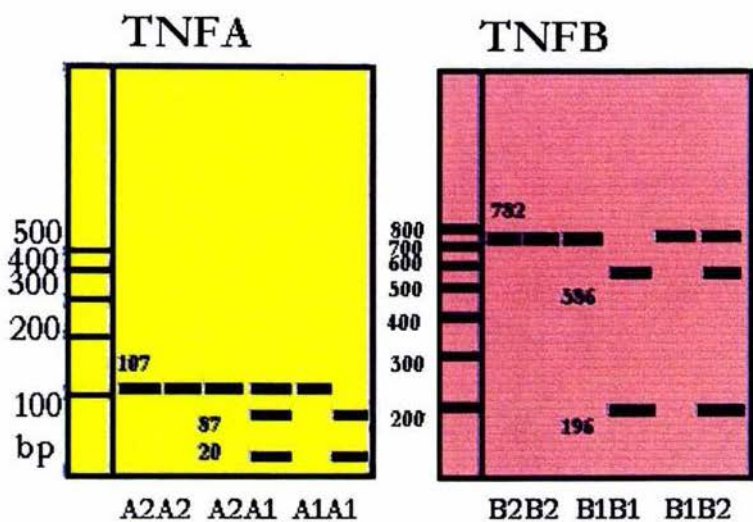
El DNA genómico de cada paciente se extrajo por procedimientos de extracción estándares con fenol/cloroformo de células mononucleares sanguíneas (62).

Una vez extraído el DNA genómico se procedió a la amplificación de las regiones específicas para cada polimorfismo.

TNFA. Se amplificó un fragmento de 107 pares de bases (bp) (posición -327 a -220) del promotor del TNFA por PCR de cada muestra con los iniciadores A1 (5' -AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT- 3') Y A2 (5' -TCC TCC CTG CTC CGA TTC CC-3') (20). El iniciador A1 se diseñó para incorporar el sitio polimórfico de TNFA en una secuencia de restricción *NcoI*. La PCR se llevó a cabo en tubos de 0.2 ml con (2 ng) de DNA genómico en 5µl de solución, el cuál sirvió como molde en una mezcla de reacción de 50 µl. Esta mezcla de reacción contenía los siguientes químicos: 20 pM de cada uno de los iniciadores (A1 y A2) en 1 µl de solución, 25 µl de Master Mix de Promega^(MR) que contiene Taq polimerasa, buffer de reacción, cloruro de magnesio y nucleosidos. Y 19µl de agua libre de nucleasas. Se llevó la amplificación en un termociclador marca Biometra^(MR) con los siguientes tiempos: un ciclo a 95° C por 2 min., seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 58° C por 45 seg. y 72°C por 30 seg.; finalmente por 7 min. a 72°C. Los productos de PCR se digirieron por toda la noche a 37°C con *NcoI* a 4UI µl de reacción. Los patrones de restricción se visualizaron bajo luz ultravioleta después de electroforesis (70 V por 45 minutos) en de gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio. La digestión por *NcoI* del DNA amplificado por PCR produce dos fragmentos uno de 20 bp (pares de bases) y

otro de 87 bp del alelo TNFA1 y un solo fragmento de 107 bp del alelo TNFA2. En los heterocigotos se aprecian tres bandas: una de 107 bp, una de 87 bp y otra más de 20 bp.

TNFB. Se amplificó un fragmento de 782 bp de DNA genómico, conteniendo el sitio polimórfico *NcoI*, se amplificó usando PCR. La PCR se llevó a cabo en tubos de 0.2 ml con (2 ng) de DNA genómico en 5 µl de solución, el cuál sirvió como molde en una mezcla de reacción de 50 µl. Esta mezcla de reacción contenía los siguientes químicos: 20 pM de cada uno de los iniciadores; 1 (5' CCG TGC TTC GTG CTT TGG ACT A 3') y el iniciador 2 (5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT C 3'); en 1µl de solución, 25 µl de Master Mix de Promega^(MR) que contiene Taq polimerasa, buffer de reacción, cloruro de magnesio y nucleosidos. Y 19µl de agua libre de nucleasas. Se llevó a cabo la amplificación en un termociclador marca Biometra^(MR) con los siguientes tiempos: un paso de desnaturalización por 3 min. a 95°C, seguido por 37 ciclos de una desnaturalización por 30 seg. a 95°C, un alineamiento por 30 seg. a 57°C, y una extensión por 45 seg. a 72°C. y una extensión final por 6 min. a 72°C. Los productos de PCR se digirieron por 4 hrs. a 37°C con *NcoI* a 10UI µl de reacción. Los patrones de restricción se visualizaron bajo luz ultravioleta después de electroforesis (70 V por 45 min.) en de gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. La digestión por *NcoI* del DNA amplificado por PCR produce los siguientes fragmentos: el original de 782 bp (pacientes homocigotos para el alelo TNFB2, careciendo del sitio *NcoI*), tres fragmentos de 782, 586 y 196 bp de longitud (pacientes heterocigotos), o dos fragmentos de 586 y 196 bp de tamaño (pacientes homocigotos para el alelo TNFB1). Como se ejemplifica en el siguiente dibujo:



En la figura se ejemplifican a las bandas amplificadas por PCR (carriles 1, 3 y 5) Así como el producto de la digestión con NcoI (carriles 2,4 y 6) y con ello los diferentes genotipos para TNF α y para TNF β que pueden obtenerse. Los números de la izquierda representan la cantidad en pares de bases.

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” con el número: **2001-693-009**.

Este estudio se apega a la norma ética de la Ley General de Salud y la declaración de Helsinki, enmendada en 1993. Así como al Código Sanitario de los estados unidos Mexicanos.

El estudio se considera de riesgo mínimo ya que solo se realizará una punción venosa, la cual de presentar alguna complicación será tratada oportunamente. El paciente recibió toda la información acerca del propósito del estudio, de los posibles efectos secundarios de la punción, tuvo derecho a negarse a participar en el mismo sin que ello repercutiera en la calidad de su atención y se le informó además que sus datos se manejaron de manera confidencial.

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Para el cálculo de tamaño de la muestra, se utilizó la frecuencia general de los alelos en controles sanos reportada en estudios previos (22, 23), la diferencia estimada para el alelo A2 y el alelo B2 en pacientes con tuberculosis crónica es de 25%, se aplicó la fórmula de estadígrafo z (64) teniendo una n de 38 pacientes para TNFA y 48 pacientes para TNFB por grupo, con un α de 0.05 y β de 0.20.

Como en un mismo paciente se determinaron los dos genotipos (alfa y beta) concluimos que con un grupo de 48 pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento y 48 pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento se completaba la muestra necesaria. Además se agregó un grupo de 48 sujetos sanos y 48 sujetos con diabetes mellitus.

Al calcular el poder del tamaño de la muestra obtuvimos que con 42 pacientes por grupo se alcanzaba un 80% de este.

El grupo de pacientes con tuberculosis sin respuesta al tratamiento tiene un total de 42 sujetos incluidos, y el resto de los grupos tienen 48 el 100% de la muestra estimada al inicio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Primero Se examinaron los grupos mediante estadística descriptiva, utilizando para las variables cuantitativas medidas de tendencia central y dispersión, para las variables nominales tablas de frecuencia y / o porcentajes.

Para determinar las posibles asociaciones de las variables en los grupos, en la estadística analítica se utilizaron tablas de contingencia y X^2 de independencia.

Para las variables continuas se aplicó suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney)

Se consideró significancia estadística una $P \leq 0.05$. Se calculó Odds Ratio con 95% de IC.

RESULTADOS:

Se estudiaron un total de 186 sujetos en 4 grupos de estudio.

En el grupo 1 se estudiaron 42 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento. En el grupo 2 se incluyeron 48 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento. En el grupo 3 se incluyeron 48 pacientes con diabetes mellitus controlada y en el grupo 4, 48 sujetos sanos (donadores de sangre).

Los resultados generales de los pacientes estudiados se muestran en el **cuadro 1**.

De los 186 sujetos 90 (48%) correspondieron al género masculino y 96 (52 %) al femenino. Encontramos mayor número de mujeres en los diabéticos $p<0.05$ debido a mayor afluencia a las citas programadas en segundo nivel por parte de mujeres y un mayor número de hombres en los sanos $p<0.05$ debido a mayor porcentaje de donadores sanos varones que mujeres donadoras.

La edad de los grupos de pacientes sin y con respuesta al tratamiento y de los diabéticos sin tuberculosis fue muy similar, en los sanos la mediana encontrada es de 35 años ($p<0.01$) debido a que son donadores sanos de sangre y sus componentes en cuyo proceso de selección existe una limitante de edad de 18 a 65 años como máximo.

La presencia de diabetes mellitus en los grupos con tuberculosis con y sin respuesta al tratamiento presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con mayor frecuencia de diabetes y tuberculosis en el grupo sin respuesta al tratamiento (grupo 1).

El tiempo de evolución de la diabetes mellitus entre los 3 grupos de pacientes fue muy similar: de 10 a 12 años, sin embargo los rangos de los controles fue menor, de 3 a 22 años. El tiempo de evolución de la tuberculosis pulmonar entre los grupos fue mayor en el grupo 1 (sin respuesta al tratamiento) con una mediana de 24 meses (rango de 6 a 252 meses) con una $p<0.001$ que en el grupo 2 (con respuesta al tratamiento) mediana de 6 meses (rangos de 5 a 48 meses) lo cual constituyó además un criterio de inclusión en cada grupo.

El tiempo de tratamiento efectivo para tuberculosis pulmonar fue mayor para el grupo 1 (mediana de 17 meses $-p<0.001$) que el grupo 2 (mediana de 6 meses) lo cual también constituyó un criterio de inclusión para cada grupo.

Los esquemas de tratamiento completos (TAES de 6 meses o tradicional de 8 meses) recibidos por los pacientes fueron mas en el grupo 1 que en el grupo 2 ($p < 0.001$). Recibiendo el grupo 1 de 2 a 5 esquemas desde el inicio de la enfermedad y sólo uno recibido por el grupo control. En la aplicación de TAES se pudo corroborar que los pacientes recibieron cuando menos 1 esquema en alguno de los varios esquemas recibidos a lo largo de la evolución de la enfermedad, mientras que los controles al ser su primer cuadro de la enfermedad hasta un 75% lo recibieron en el primer esquema de tratamiento. Se confirmó drogorresistencia en 8 de los 42 (19%) pacientes sin respuesta al tratamiento. La resistencia más frecuente fue a: isoniacida, rifampicina y etambutol, todos los pacientes fueron multidrogorresistentes. Los datos generales de la drogorresistencia se ilustran en el **cuadro 2**. Para el análisis de los datos los pacientes con drogorresistencia se excluyeron.

FRECUENCIA DE ALELOS

TNF α

Para el alelo del TNF α se obtuvieron las siguientes frecuencias:

Se analizaron 372 alelos en los cuatro grupos de estudio, de los cuales 333 correspondieron al alelo A1 y 39 al alelo A2, entre los 4 grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El grupo 1 (pacientes con tuberculosis sin respuesta al tratamiento) se encontraron 75 (89%) del alelo A1 y 9 (11%) del alelo A2. El grupo 2 (con respuesta al tratamiento) presentó una frecuencia de 85 (88.5%) de alelo A1 y 11 (11.5%) del alelo A2. El grupo 3 (pacientes con diabetes mellitus) presento una frecuencia de 87 (90%) del alelo A1 y 9 (10%) del alelo A2. Por su parte el grupo de sanos (grupo 4) presentó 86 (89%) del alelo A1 y 10 (11%) del alelo A2. En la **Gráfica 1** se muestra la distribución de los alelos alfa en los cuatro grupos. No se encuentra diferencia estadísticamente significativa.

TNF β

Para el gen del TNF β se estudiaron 372 alelos en los cuatro grupos de los cuales 113 (30%) correspondieron al B1 y 259

(70%) al alelo B2. En el grupo 1 se encontró una frecuencia de 31 (37%) para el alelo B1 y 53 (63%) para el alelo B2. En el grupo 2 se encontró una frecuencia de 36 (37%) para el alelo B1 y de 60 (63%) para el alelo B2, sin encontrarse una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos. En el grupo 3 se encontró una frecuencia de 29 (30%) para el alelo B1 y de 67 (70%) para el alelo B2. En el grupo de sanos (4) se encontró una frecuencia de 17 (18%) para el alelo B1 y de 79 (82%) para el alelo B2. Este grupo presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al resto de los grupos.

En la **Gráfica 2** se muestra la distribución de los alelos β en los cuatro grupos y las diferencias estadísticamente significativas.

FRECUENCIA DE GENOTIPOS.

Genotipos α

Se estudiaron un total de 186 genotipos para el gen del TNF α -308 del promotor con una frecuencia general de: 160 (86%) para el genotipo homocigoto A1A1, 13 (7%) para el genotipo heterocigoto A1A2 y de 13 (7%) para el genotipo homocigoto A2A2. No se encontró diferencias en la distribución de los genotipos entre los pacientes sin respuesta al tratamiento y aquellos con respuesta al mismo. La distribución de genotipos A1A2 ($p < 0.05$ un OR de 7.7 con un IC del 95% de 8-30) y el genotipo A2A2 ($p < 0.05$ OR de 0.2 con un IC del 95% de 0-14) en el grupo de diabéticos con respecto al resto de los grupos

Cuadro 3.

En la **Gráfica 3** se muestra la distribución de los genotipos TNF α así como las diferencias encontradas entre los grupos, estos hallazgos sugieren que el genotipo A1A2 parece estar asociado a diabetes mellitus en nuestra población, por su parte el resto de los genotipos parecen no tener relación con la respuesta al tratamiento en la tuberculosis pulmonar. Se realizó ajuste por drogoresistencia sin modificación de los resultados mencionados

Genotipos β

Se estudiaron un total de 186 genotipos para el gen del TNF β con una frecuencia general de 16 (9%) para el genotipo homocigoto B1B1, 81 (43%) para el genotipo heterocigoto B1B2 y 89 (48%) para el genotipo homocigoto B2B2. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos: para el genotipo B1B1 se encontró una $p < 0.01$ con un OR de 3.25 y un IC del 95% de 2-20 en el grupo de pacientes con tuberculosis con respuesta al tratamiento (grupo 2) con respecto al resto de grupos. Para el genotipo B1B2 (heterocigoto) se obtuvo una $p < 0.01$ con un OR de 3.0 un IC del 95% de 13-41 en el grupo de pacientes sin respuesta al tratamiento (1) con respecto a los sanos. Y para el genotipo B2B2 se obtuvo una $p < 0.01$ un OR de 0.31 y un IC del 95% de 13-45.

Cuadro 3.

Por su parte el genotipo B1B2 parece estar más relacionado con mala respuesta al tratamiento en los pacientes con tuberculosis. El genotipo B1B1 se encontró más frecuente en el grupo de controles. El genotipo B2B2 se encontró con mayor frecuencia en el grupo de sanos, al parecer confiere protección a la enfermedad. **Gráfica 4.**

Al comparar los genotipos del grupo de pacientes sin respuesta al tratamiento (1) con los de respuesta al tratamiento (2) se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ($p < 0.05$) debido principalmente a los genotipos B1B1 que fue más frecuente en el grupo con respuesta al tratamiento (2), el genotipo B1B2 más frecuente en el grupo de pacientes sin respuesta al tratamiento (1) y el genotipo B2B2 proporcionalmente fue más frecuente en el grupo con respuesta al tratamiento que el grupo sin respuesta. Lo cual apoya la teoría de que el genotipo B2B2 confiere protección a la enfermedad y una mejor respuesta al tratamiento y por el contrario el genotipo B1B2 parece predisponer a una mala respuesta al tratamiento. **Gráfica 5.**

Se realizó ajuste por drogoresistencia debido a que en un principio se creyó que podría modificar la distribución de los genotipos sin embargo no se modificaron los resultados presentados.

Al comparar por separado al grupo de pacientes sin respuesta al tratamiento y el grupo de los sanos encontramos que las diferencias (mostradas en la gráfica 4) se hicieron más evidentes. El genotipo B1B2 comparado con los sanos tuvo una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.01$ un OR de 4.8 con un IC del 95% de 17 a 57.

El genotipo B2B2 del grupo de sanos comparado con los pacientes tuvo una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.01$ un OR de 0.20 y un IC del 95% de 18 a 58.

Gráfica 6.

Los pacientes con el genotipo B1B2 y B2B2 del grupo sin respuesta al tratamiento tuvieron un tiempo de evolución similar, también en cuanto al número de esquemas de tratamiento recibido. En cuanto al número de recaídas; los pacientes con el genotipo B1B2 presentaron un mayor número (11- 69%) que los pacientes con el genotipo B2B2 (5 -31%), por su parte la frecuencia de diabetes mellitus en los pacientes con genotipo B1B2 fue de 19 (73%) y los pacientes con B2B2 fue de 7 (27%), en cuanto a la drogorresistencia el genotipo B1B2 presentó el 4 (50%) y el B2B2 3 (37%) y el B1B1 1 (13%) en estos tres puntos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. El grupo de pacientes con respuesta al tratamiento por su parte, varió un poco en cuanto al tiempo de evolución entre los pacientes con un genotipo u otro, el B1B2 tuvo una mediana de 8 meses y el B2B2 de 6 meses, la presencia de diabetes mellitus en cada genotipo fue de 8 (50%) para el B1B2, 4 (25%) para el B2B2, y 4 (25%) para el B1B1, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en éstos puntos. El grupo de pacientes con respuesta al tratamiento tiene una distribución distinta al grupo de sanos ($p < 0.05$). A pesar de presentar diferencias marcadas en la distribución de los genotipos β entre los grupos sin respuesta al tratamiento y con respuesta al tratamiento con respecto al grupo de sanos, el de diabéticos muestra similitudes correspondientes con los tres grupos. El valor de p entre los grupos sin respuesta al tratamiento y con respuesta al tratamiento con respecto al de diabéticos fue $p < 0.20$ y entre los grupos diabéticos comparado al de los sanos fue de $p < 0.11$.

DISCUSION:

La distribución de los genotipos de los genes del TNF α y β parecen tener una distribución étnica ya que su frecuencia varía dependiendo de la población estudiada, además de su asociación ya conocida con el Complejo Principal de Histocompatibilidad (18,19,20).

Actualmente se encuentra en estudio la relación que pudiese existir entre los polimorfismos de éstos genes (TNF α y β) y diversas enfermedades. La relación entre los polimorfismos y situaciones clínicas se ha demostrado ya en varias patologías como por ejemplo la sepsis, la falla orgánica múltiple y la malaria cerebral con una relación directa entre la frecuencia aumentada de genotipos A2A2 y B2B2 con un aumento de producción de TNF α circulante (**Hiperproductores de TNF α**) con mal pronóstico o muerte del paciente (21, 22,25).

Cuadro 4.

En la tuberculosis no se ha reportado un resultado concluyente al respecto. Delgado y Cols (18) mencionan que en algunas poblaciones el polimorfismo de TNF α (genotipo A2A2 específicamente) parece conferir susceptibilidad a la enfermedad y en otras no.

En nuestro estudio las frecuencias encontradas de los alelos presentaron similitudes con respecto a las cifras reportadas en la literatura: la frecuencia general del alelo TNFA1 (con Guanina y **normoproducer de TNF α**) reportada por Roberts fue de 89% y la del alelo TNFA2 (con Adenina e hiperproductor de TNF α) fue de 11%, en nuestros controles sanos las frecuencias son: TNFA1 84% y el TNFA2 en 16% con una diferencia no significativa estadísticamente (22).

Hoffmann y Cols. En un estudio realizado en Bethesda E. U. (65) mencionan que en poblaciones de origen racial étnico diferente como: blancos, negros, hispanos y asiáticos, las frecuencias de los polimorfismos del TNF alfa en el promotor (-308), no fueron diferentes lo cual viene a apoyar los resultados obtenidos en éste estudio.

Para el alelo TNFB1 (**normoproducer de TNF α**) encontramos una frecuencia en nuestra población de sanos de 18%, más baja que la reportada por Stuber y Cols (22) donde ellos encuentran un 35% y para el alelo TNFB2 (hiperproductor de TNF α) nosotros encontramos una frecuencia de 82% mucho más alta que la reportada por el mismo autor de 65% con una $p < 0.01$. Lo cual puede explicarse por las diferencias raciales entre las dos poblaciones

Stuber estudia una población blanca europea (alemanes) y nosotros una población mestiza mexicana.

En relación a las frecuencias de los genotipos A1A1 (homocigoto) encontrados en los diferentes grupos de estudio en el gen de TNF α una distribución similar en los tres grupos en concordancia con las frecuencias encontradas en la población sana, sin embargo en el grupo de diabéticos sin tuberculosis encontramos una frecuencia aumentada del genotipo heterocigoto de 19 % (9/48) con una diferencia significativa ($P<0.01$) cifra que concuerda con la distribución encontrada por Koch et al (66) en Alemania en un grupo de pacientes con diabetes mellitus, no reportando asociación con algún genotipo en particular. Pero que difiere con los resultados de Ishii Et al (67) en Japón que solo encontró 3.3% de pacientes diabéticos con éste genotipo, pero él si reporta una tendencia del genotipo A1A1 en los pacientes con resistencia a la insulina. Wybranska et al (68) en Polonia reporta una frecuencia mayor que la encontrada en nuestra población de diabéticos (46% genotipo A1A2) como factor de riesgo para predisponer a la resistencia a la insulina, lo que nos lleva a pensar que esta variable del gen puede ser más frecuente en sujetos con diabetes mellitus y se encuentra condicionada étnicamente. En el mismo grupo de pacientes con diabetes no se encontró ningún genotipo A2A2 (0%, genotipo hiperproductor de TNF α) mostrando nuevamente una diferencia significativa ($p<0.05$). Sin semejanza con frecuencias en otros estudios similares realizados en pacientes con diabetes. Shiau y Cols (69) mencionan que la correlación entre los genotipos del promotor del TNF α y la diabetes mellitas tipo 2 es controversial porque existen discrepancias entre los diferentes estudios reportados. Las diferencias étnicas juegan un rol muy importante en éstas diferencias, ya que la distribución de los polimorfismos del promotor de TNF α es diferente entre los sujetos de estudio con origen racial diverso (70,71).

Las frecuencias de los polimorfismos reportadas en la literatura incluyen en su gran mayoría solo al gen del TNF α en la región del promotor principalmente. En lo que respecta al gen del TNF β sólo se ha reportado asociado a enfermedades por Gram negativos (entre ellas la sepsis y la falla orgánica múltiple). En diabetes mellitus existen escasos reportes que lo asocien con la patogenia de la enfermedad. Solo Kankova y cols. (72) mencionan que encontraron una relación de los polimorfismos con colesterol de baja densidad y colesterol total en el grupo de no obesos. Sin embargo en nuestro estudio las frecuencias encontradas

son muy similares entre los grupos de tuberculosis y diabéticos y el grupo de diabéticos puros, mostrando solo una diferencia con respecto al grupo de sanos. El genotipo más frecuente en estos grupos es el B1B2 (heterocigoto) el cual se considera productor moderado de TNF α circulante. El grupo de pacientes con tuberculosis sin respuesta al tratamiento presentó un OR de 3.0, indicando que los pacientes con este genotipo tienen un riesgo tres veces mayor de presentar cuadros de tuberculosis de larga evolución y con mala respuesta al tratamiento. Además, parece predisponer a enfermedades crónico-degenerativas e infecciosas crónicas, como lo son en este caso la diabetes mellitus y la tuberculosis, respectivamente. El genotipo B2B2 fue más frecuente en el grupo de sanos este genotipo se considera hiperproductor de TNF α , con una asociación ya mencionada a enfermedades infecciosas y parasitarias. En el grupo de sanos su frecuencia mostró una diferencia estadísticamente significativa y un OR de 0.31 lo cual parece indicar que comparado con el resto de los grupos ésta variante parece conferir cierta protección a la enfermedad. El genotipo B1B1 tuvo una frecuencia, elevada en el grupo con buena respuesta al tratamiento (grupo 2); este genotipo se considera normoprodutor de TNF α , mostrando un OR de 3.25, indicando que los pacientes con tuberculosis pulmonar con la mencionada variante tienen tres veces más posibilidades de padecer la enfermedad y tener buena respuesta al primer tratamiento.

Con respecto a la drogorresistencia en los pacientes sin respuesta al tratamiento (grupo 1) que fue de 19%, menor a la reportada por Laniano- Laborín y cols. (73) de 49%, en pacientes que ya habían recibido esquemas de tratamiento previos. Se realizó un ajuste (se eliminaron del análisis) en las pruebas estadísticas realizadas para estar seguros que la drogorresistencia no interfiere con la frecuencia de los genotipos, obteniendo las misma significancia estadística. Estos autores (73) además, mencionan que la terapia con TAES es muy necesaria pero no suficiente para controlar la tuberculosis, ya que un 8.4% de los pacientes que nunca habían recibido tratamiento hicieron drogorresistencia. Algo similar es reportado por Frothingham y cols. (74) quien menciona sólo un 95% de curación con este esquema, en nuestro pacientes encontramos un 19% en quienes ya habían recibido esquemas previos; sin embargo estos hallazgos pueden explicar las altas tasas de drogorresistencia global reportadas en nuestro país (21%) a fármacos antituberculosis primarios y de 6% a multidrogorresistencia. A pesar de mencionarse que en nuestro país

existe una cobertura del 100% con la estrategia TAES nosotros sólo encontramos un 83% de cobertura en el grupo sin respuesta al tratamiento y un 75% en el grupo con buena respuesta al tratamiento. En el grupo de buena respuesta al tratamiento no se corroboró ningún caso de resistencia a fármacos, debido: 1° al corto tiempo de evolución en que fueron seleccionados y 2do aquellos que presentaban baciloscopías y cultivos positivos se pasaron al grupo con respuesta al tratamiento.

Nuestra hipótesis inicial apostaba por una mayor frecuencia de alelos B2 y genotipos B2B2 en el grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento en concordancia con lo encontrado en la literatura, sin embargo en la tuberculosis pulmonar el mecanismo parece ser diferente, y la presencia de los alelos B2 y genotipos B2B2 parecer conferir cierta protección a la tuberculosis. Partiendo del sitio de producción de la citocina la falla orgánica múltiple se debe a producción sistémica, mientras que en la tuberculosis la producción local parece jugar un papel importante, pues el genotipo hiperproductor parece fomentar la formación del granuloma y la contención de la infección. Mientras que por su parte los pacientes con el genotipo B1B2 parecen no lograr una producción suficiente para la adecuada y eficiente respuesta protectora.

(17, 22,41)

CONCLUSIONES:

La respuesta al tratamiento en la tuberculosis pulmonar parece no estar relacionada con la presencia de los alelos A1 o A2 del promotor, ni con los diferentes genotipos del gen del TNF α . Los pacientes con diabetes mellitus sin tuberculosis presentan una mayor frecuencia del genotipo A1A2 en nuestra población.

En los pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento el genotipo más frecuente fue el TNF B1B2, al parecer confiere mayor susceptibilidad a la enfermedad y menor respuesta al tratamiento.

En los pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento y en los individuos sanos en nuestro estudio, el alelo B2 y el genotipo B2B2 fueron los más frecuentes, al parecer están relacionados con protección a la tuberculosis pulmonar y con buena respuesta al tratamiento.

Los diferentes genotipos del TNF β no parecen estar relacionados con diabetes mellitus de la manera como parece estarlo el genotipo A1A2 del TNF α .

La drogorresistencia no parece afectar la distribución de los genotipos en los grupos de estudio.

Perspectiva

En los resultados obtenidos en el estudio, se aprecia que la frecuencia del genotipo del TNF β hiperproductor de TNF α B2B2 es más frecuente en sanos y en pacientes con tuberculosis pulmonar con buena respuesta al tratamiento, sin embargo se necesitan estudios más controlados para establecer una relación causa efecto más sólida.

Por la misma razón se han puesto en marcha 2 estudios relacionados con el tema central: TNF α / β en tuberculosis pulmonar. Uno de ellos pretende identificar polimorfismos genéticos de citocinas relacionadas, como IL-6 e IL-10 y en el otro proyecto se pretende estimular con BCG a células mononucleares de sangre periférica de pacientes con los diferentes genotipos del TNF tanto α como β y medir la producción de la citocina *in vitro*. De esta manera conocer si el polimorfismo en el gen del TNF α / β influye en la producción de la citocina en pacientes con tuberculosis pulmonar.

El gen del TNF α y β se codifica en la región clase III del Complejo Principal de Histocompatibilidad por ello es importante también conocer si existe alguna relación con la distribución de los haplotipos HLA DR3 o HLA DR4 en la población mexicana.

CUADROS Y GRAFICAS

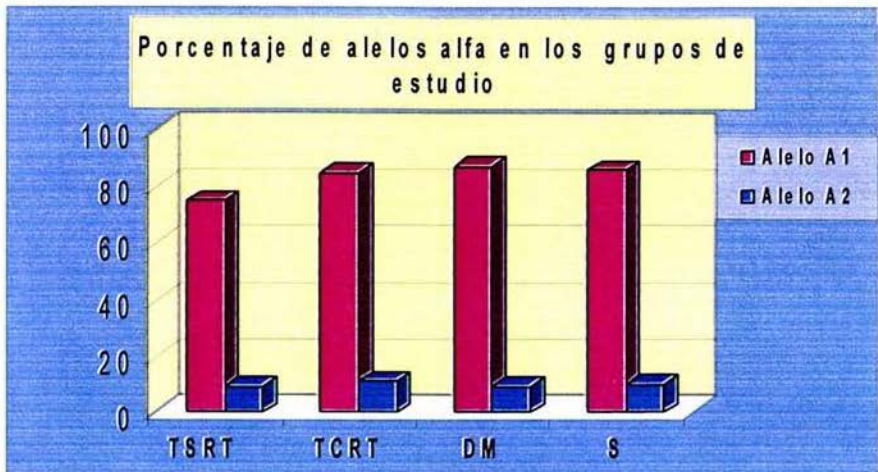
Grupos de estudio					
	tuberculosis sin respuesta al tratamiento (1)	tuberculosis con respuesta al tratamiento (2)	Diabéticos sin tuberculosis (3)	Sanos (4)	Valor de p ($\alpha < 0.05$)
Género	23H (55%) 19M (45%)	24H(50%) 24M(50%)	15H(31%)* 33M(69%)	28H(58%) 20M(42%)	<0.05 <0.05
Edad	Md 55 años	Md 61 años	Md 60 años	Md 35 años*	<0.01
Rangos	21-76 años	21-87 años	36-79 años	19-57 años	
Diabetes mellitus	Sí 27 (64%)* No 15 (36%)	Sí 16 (34%) No 32 (66%)	48 (100%) 0	0	<0.05*
Tiempo de Evolución diabetes	Md 12 años	Md 11 años	Md 10años	0	NS
Rangos	7-28 años	3-22 años	6 meses a 33 años		
Tiempo de Evolución tuberculosis	Md 24 meses*	Md 6 meses	0	0	<0.001
Rangos	6-252 meses	5-48 mese			
Tiempo de tratamiento efectivo para tuberculosis	Md 17 meses	Md 6 meses	0	0	<0.001
Rangos	5-96 meses	5- 12 meses			
Tratamiento para tuberculosis	Md 2 esquemas	Md 1 esquema	0	0	<0.001
Rangos	2-5 esquemas	1 esquema			
TAES	Sí 35 (83%) No 7 (17%)	Sí 36 (75%) No 12(25%)	0	0	NS
Drogorresistencia	Sí 8 (19%) No 34 (81%)	0	0	0	<0.05

Cuadro 1. Se muestran los resultados generales de los 4 grupos estudiados y su significancia estadística con el valor de p. H hombres. M mujeres. Md mediana. NS no significativa. TAES tratamiento acordado estrictamente supervisado.

Pacientes del grupo 1 (con tuberculosis sin respuesta al tratamiento) en quienes se confirmó resistencia a fármacos.

*Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
*Edad en años	46	61	35	38	35	33	37	58
*Género Hombre Mujer	H	H	H	H	H	M	M	H
*Presencia de Diabetes Mellitus	NO	NO	NO	SI	SI	NO	NO	SI
*Tiempo de evolución de la TBP (años)	21	16	16	5	4	2	4	8
*Tiempo de Tratamiento efectivo.	4 a	40m	40m	4 a	3 a	16m	2 a	19m
*Esquemas de tratamiento recibidos	5	5	5	2	2	2	3	3
*Resistencia a.								
Esteptomicina	X			X		X		X
Isoniacida	X	X	X	X	X	X	X	X
Rifampicina	X	X	X	X	X	X	X	X
Etambutol	X		X	X	X	X	X	
Rifabirina	X				X			
Etionamida	X		X					
Kanamicina	X		X					
Amikacina	X		X					
Ofloxacina			X					
Ciprofloxacina			X					
Pirazinamida				X		X	X	
*Genotipo TNFA	A1A1	A1A1	A1A1	A1A1	A1A1	A2A2	A1A1	A1A1
*Genotipo TNFB	B1B1	B2B2	B1B2	B1B2	B2B2	B1B2	B1B2	B2B2

Cuadro 2. Pacientes del grupo 1 (sin respuesta al tratamiento) en quienes se confirmó drogorresistencia a fármacos. En el cuadro se muestran los aspectos generales, la resistencia específica y el genotipo del TNF de cada paciente en particular. La letra a = años y m = meses.



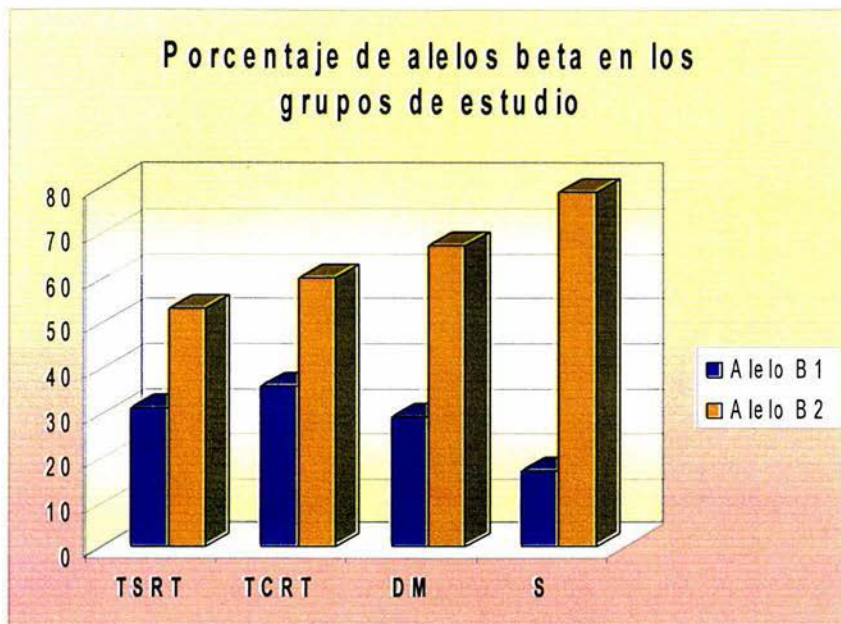
Gráfica 1. Se muestra el porcentaje de los alelos encontrados en el promotor en el sitio -308 del gen del TNF α , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos.

TSRT = Tuberculosis sin respuesta al tratamiento.

TCRT = Tuberculosis con respuesta al tratamiento.

DM= diabetes mellitus.

S = sanos.



Gráfica 2. El alelo del TNF B2 hiperproductor fue más frecuente en los sanos con una diferencia significativa: $p < 0.05$ (OR de 0.36 con IC -95%- de 8-30). Con respecto al grupo de pacientes con tuberculosis sin y con respuesta al tratamiento. Por su parte el alelo B1 normoprodutor tuvo una frecuencia mayor en los grupos de pacientes con tuberculosis con y sin respuesta al tratamiento $p < 0.05$ (OR de 2.7 con IC -95%- de 9-29).

TSRT = Tuberculosis sin respuesta al tratamiento.

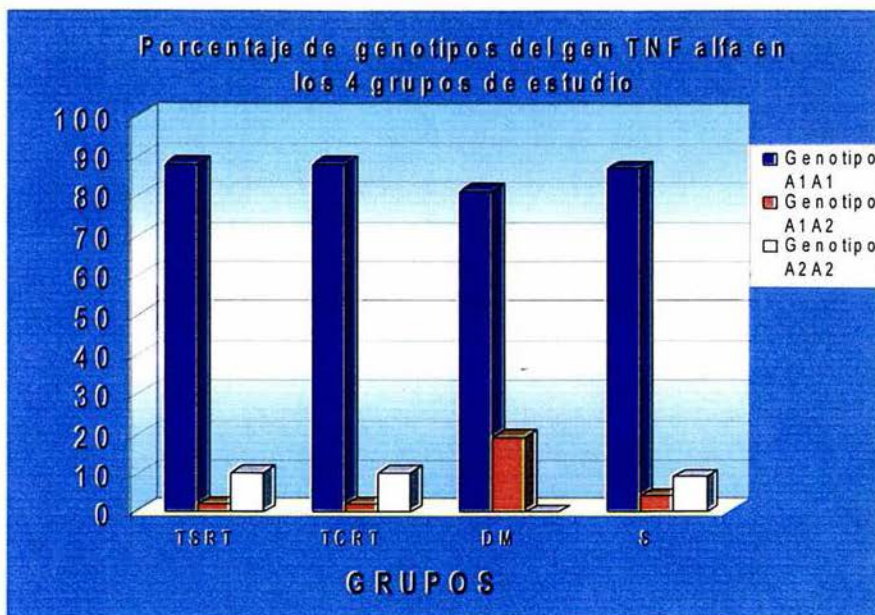
TCRT = Tuberculosis con respuesta al tratamiento.

DM= diabetes mellitus.

S = sanos.

Genotipo	Grupos de estudio				Sanos (n=48) (%)	Valor de p	OR	IC 95%
	tuberculosis sin respuesta al tratamiento (n=42) (%)	tuberculosis con respuesta al tratamiento (n=48) (%)	diabetes mellitus sin tuberculosis (n=48) (%)					
A1A1	37 (88)	42 (88)	39 (81)		42 (87)	NS	1.05	-12-14
A1A2	1 (2)	1 (2)	9 (19) *		2 (4)	<0.05	7.7	8-30
A2A2	4 (10)	5 (10)	0 (0) *		4 (9)	<0.05	0.2	0-14
B1B1	2 (5)	8 (16)*	4 (8)		2 (4)	<0.01	3.25	2-20
B1B2	27 (64)*	20 (42)	21 (44)		13 (27)	<0.01	3.0	13-41
B2B2	13 (31)	20 (42)	23 (48)		33 (69) *	<0.01	0.31	13-45

Cuadro3. Resultados generales de los genotipos obtenidos de los genes de TNF α y β , se muestra la frecuencia, el porcentaje, el valor de p, el OR (Odds Ratio) y los intervalos de confianza de 95%. Los genotipos **A2A2** y **B2B2** se consideran hiperproductores de TNF plasmático.



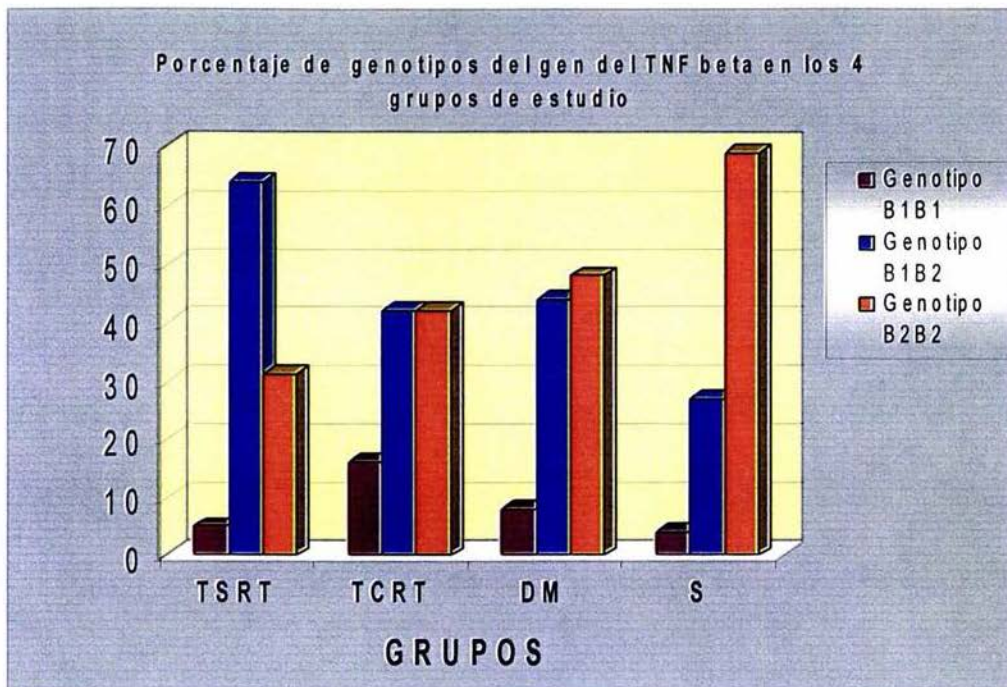
Gráfica 3. Frecuencia de los genotipos del gen del TNF α en los grupos de estudio. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el genotipo A1A2 ($p < 0.05$) y el genotipo A2A2 ($p < 0.05$) del grupo de pacientes con diabetes sin tuberculosis con respecto al resto de los grupos. El OR del genotipo A1A2 es 7.7 (IC de 5 a 13 con 95%).

TSRT = Tuberculosis sin respuesta al tratamiento.

TCRT = Tuberculosis con respuesta al tratamiento.

DM= diabetes mellitus.

S = sanos.



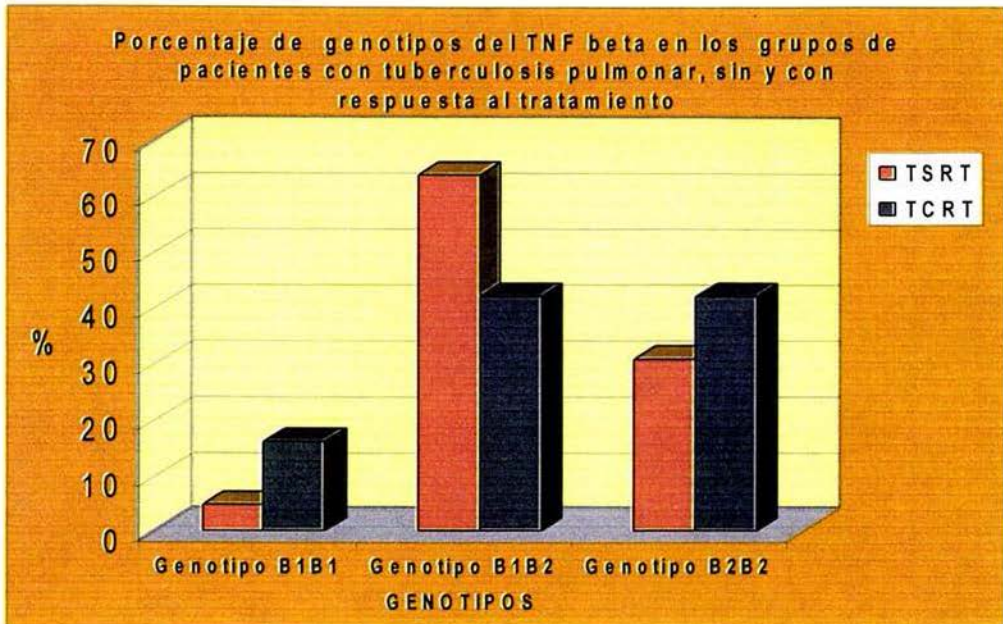
Gráfica 4. Se muestra la distribución de los genotipos del TNF β entre los grupos de estudio. El genotipo B1B2 (moderadamente productor de TNF α) fue más frecuente en el grupo de pacientes sin respuesta al tratamiento con una $p < 0.01$ (OR de 3 con un IC del 95% de 13 a 41), el genotipo B1B1 (normoprodutor de TNF α) es más frecuente en el grupo de pacientes con respuesta al tratamiento, con una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$ (OR de 3.25 con un IC de 2 a 20 con un 95%) y el genotipo B2B2 (hiperproductor de TNF) es más frecuente en el grupo de sanos con una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$ (OR de 0.31 con un IC de 13 a 45 con un 95%). Entre los grupos 2 y 3 no se encontró diferencia en la distribución de los genotipos.

TSRT = Tuberculosis sin respuesta al tratamiento.

TCRT = Tuberculosis con respuesta al tratamiento.

DM= diabetes mellitus.

S = sanos.



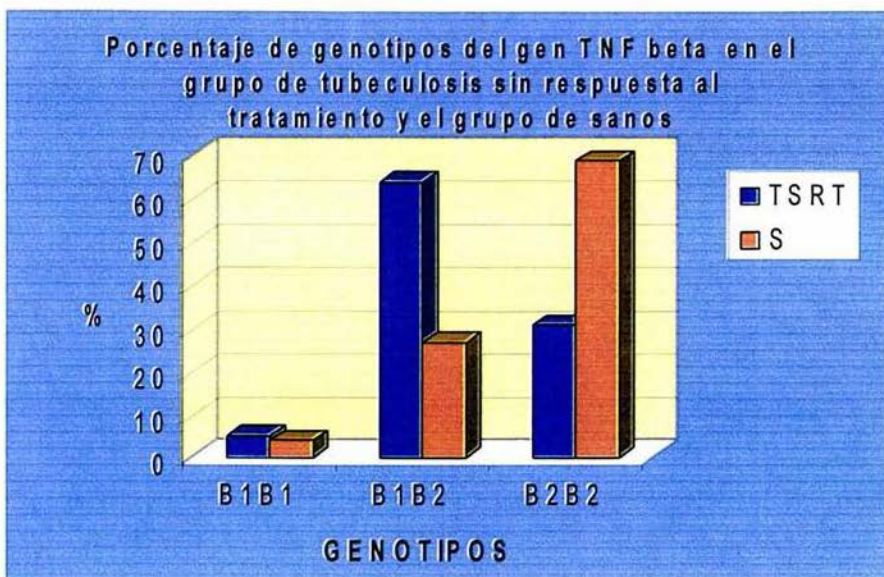
Gráfica 5. La gráfica muestra los genotipos por grupo, el genotipo B1B1 del grupo de pacientes con tuberculosis con respuesta al tratamiento comparado con el grupo sin respuesta al tratamiento. Se aprecia una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ con un OR de 4 para el grupo con respuesta al tratamiento con un IC del 95% de 5 a 17. Al comparar el genotipo B1B2 entre los dos grupos se obtiene una $p < 0.05$ con un OR de 2.52 para el grupo sin respuesta al tratamiento con un IC del 95% de 3-43. De la misma manera al comparar el genotipo B2B2 entre los dos grupos se obtiene una $p < 0.05$ con un OR de 0.62 para el grupo 2 con un IC del 95% de -10 a 30.

TSRT = Tuberculosis sin respuesta al tratamiento.

TCRT = Tuberculosis con respuesta al tratamiento.

DM= diabetes mellitus.

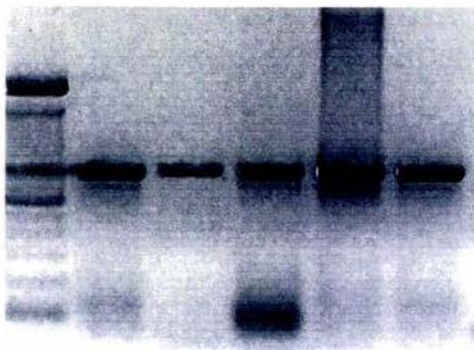
S = sanos.



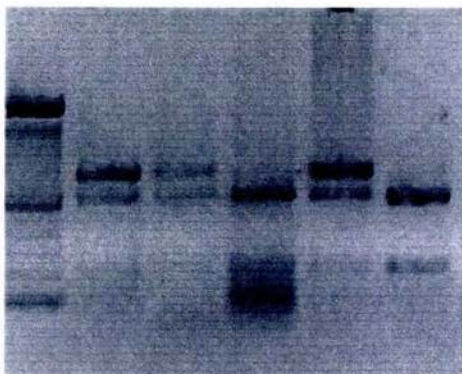
Gráfica 6. El genotipo B1B2 (moderadamente productor de TNF α) fue más frecuente en el grupo de tuberculosis sin respuesta al tratamiento, comparado con los sanos con una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.01$ un OR de 4.8 con un IC del 95% de 1.7 a 57. El genotipo B2B2 de los sanos (hiperproductor de TNF α) comparado con los pacientes tuvo una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.01$ un OR de 0.20 y un IC del 95% de 0.18 a 58.

Enfermedad	Genotipo TNF asociado	Referencia Bibliográfica
Malaria Cerebral	A2A2	25
Leishmania mucocutánea	A1A2	26
Sepsis postraumática grave	B2B2	22
Tuberculosis pulmonar	No asociación	18
Diabetes mellitus	A1A2	66,68
Diabetes mellitus	A2A2	67
En nuestro estudio encontramos:		
Tuberculosis	B1B2	
Diabetes mellitus	A1A2	
Sanos	B2B2	

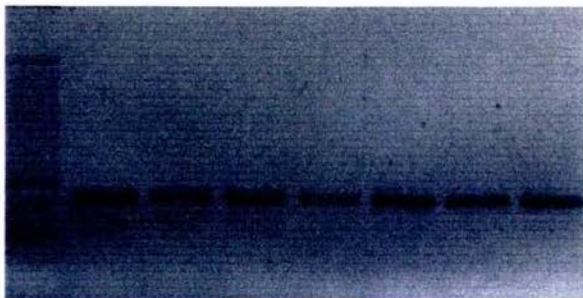
Cuadro 4. Se muestran los genotipos del TNF que se han asociado a enfermedades infecciosas y crónicas degenerativas, así como los polimorfismos encontrados en nuestro estudio.



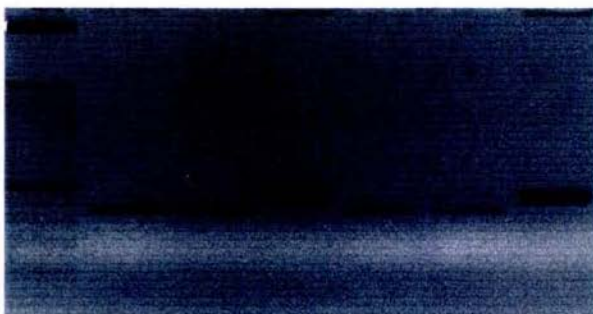
Fotografía 1. En la imagen tomada con luz UV a un gel de agarosa al 1.5% que muestra la amplificación de los productos de PCR para el TNF β . En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular y del 2 al 6 las muestras correspondientes a los pacientes asignados a las claves numéricas 51, 52, 56, 57, 58 respectivamente. Las bandas obtenidas corresponden a un tamaño de 782 pares de bases.



Fotografía 2. En la imagen tomada con luz UV a un gel de agarosa al 1.5% que muestra lo productos de la digestión con NcoI (10 U por 4 Hrs. a 37°C). En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular (bp), en el carril 2,3 y 5 las muestras 51, 52 y 57 que presentan digestión en tres bandas una de 782 otra de 586 bp y en la región de los 196 bp se aprecia la tercera de manera tenue. Correspondiendo esta digestión con heterocigotos (B1B2) para el gen del TNF beta. En los carriles 4 y 6 que corresponden a las muestras 56 y 58 se aprecian sólo dos bandas (una de 586 y otra de 196 bp) como producto de la digestión, correspondiendo al homocigoto para B1B1 del gen del TNF β .



Fotografía 3. En la imagen tomada con luz UV a un gel de agarosa al 3.5% que muestra la amplificación de los productos de PCR para el TNF α . En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular (bp) y del 2 al 8 muestras de pacientes asignados con la claves numéricas 3,9,10,11,12,13 y 14. Las bandas obtenidas corresponden a un tamaño de 107 pares de bases.



Fotografía 4. En la imagen tomada con luz UV a un gel de agarosa al 3.5% que muestra los productos de la digestión con NcoI (10 U por 4 Hrs. a 37°C). En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular (bp), en el carril 2, 3, 5 las muestras 3, 9 y 10 que presentan digestión en dos bandas una de 87 y otra de 20 bp (la cual no se aprecia dado su tamaño). Correspondiendo esta digestión con homocigotos A1A1 para el gen del TNF alfa. En el carril 6 que corresponde a la muestra 11 se aprecian dos bandas una de 107, otra de 87 bp (la tercera no se aprecia) correspondiendo al genotipo heterocigoto del gen del TNF alfa. En los carriles 4 y 7 se aprecian los controles positivos para el homocigoto del TNF α polimórfico A2A2 de 107 bp.

BILIOGRAFIA:

1. Zúñiga Ramos J, Pérez Lina E, Quiroz V, Vargas-Alarcón, García A, Vargas A y Cols. **Aspectos inmunogenéticos de la tuberculosis pulmonar.** Rev. Inst. Nal Enf Resp Mex. 2000; 13 (4):240-47.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione M **Consensus statement: global burden of tuberculosis; estimated incidence, prevalence, and mortality by country.** WHO Global Surveillance and Monitoring Project. J. Am Med As. 1999, 282:677-86.
3. Segura DJ, **Temas selectos de Infectología en pacientes adultos.** Revista del sistema de educación continua para el médico general y familiar AC.1999 (8):7-11.
4. Kaufmann SH. **Protection against tuberculosis: Cytokines, T cells and macrophages.** Ann Reum Dis 2002, 61(Sii):ii54-ii58.
5. Lugo P E, Viramonte MJ, Cicero S R, Chay E L, Peña V M. **Tuberculosis pulmonar. Problema hospitalario vigente.** Rev Inst Nal Enf Resp Mex.1994, 7 (2):131-36
6. Calderón J E, Alvarez H L, Arredondo G J, Barriga A G, Briones L E, Caltenco S R y Cols. **Tuberculosis pulmonar: vieja enfermedad, nuevos problemas.** Infect Clin. 2000; 2 (3): 25-36.
7. Vargas Ruíz M, Ríos Nuñez L, Salazar Lezamas M, Cano Valle F. **Costos de atención de la tuberculosis: caso del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)** Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2003 (16):219-225
8. Espinal MA, Laserson K, Camacho M, Fusheng Z, Kim SJ, Tlali RE et al. **Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries.** Int J Tuberc Dis. 2001, 5 (10):885-86.
9. Treatment of tuberculosis British Medical Journal 2003. 327(11): 822-823
10. Pérez GC, Torres CA, Quiñones FF, Villareal VH. **Tuberculosis drogorresistente: algunas consideraciones clínicas.** Rev Inst Nal Enf Resp Mex.1999, 12 (2): 143-47.
11. Crofton J, Grosset J, Harris W, Home N, Iseman M, Watt B. **Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis.** WHO 1997, WHO/TB/96.210 (Rev 1):7-8.

12. Sevim T, Atac G, Gungor G, Torun I, Aksoy E, Gemci, et al. **Treatment outcome of relapse and defaulter pulmonary tuberculosis patients.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002, 6 (4): 320-25.
13. Díaz S, Novalés S, González B. **Aspectos generales de la respuesta inmune ante *Mycobacterium tuberculosis*.** *Rev Mex Derma* 2001, 45 (2):82-87.
14. Sahrma S, Bose M. **Role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis.** *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2001, 19 (3):213-19.
15. Engele M, Stossel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P. **Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Immunol.* 2002,168(3): 1328-37.
16. Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, Tan X, Skerret S, Wilson CB. **Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection.** *Infect Immun.* 2002, 70 (4):2082-89.
17. Kevin J, Tracey M, Anthony C. **Tumor necrosis factor: an update review of its biology.** *Crit Care Med.*1993, 21 (10):S145-S422.
18. Delgado J, Baena A, Sok T, Goldfeld. **Ethnic-Specific genetic associations with pulmonary tuberculosis.** *J INF Dis* 2002, 186: 1463-68.
19. Selvaraj P, Sriram U, Mathan S, Reetha A, Narayanan P. **Tumor necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene polymorphism in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA_A, B and DR genes.** *Tuberculosis.* 2001, 81(5):335-41.
20. Granados A, Zúñiga J. **Inmunogenética del complejo Mayor de Histocompatibilidad.** Pág. 763-795. Guizar J. *Genética Clínica* 2001. 3ra. Ed.
21. Wilson A, Symons J, Macdowell T, McDevitt H, Duff G. **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation.** 1997, *PNAS*, 94 :3195-99.
22. Stuber F, Petersen M, Bokelman F, Schade U. **A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- α concentrations and outcome of patients with severe sepsis.** *Crit Care Med.* 1996; 24 (3) : 381-84.

23. Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deverlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA et al. **Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor α gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes.** Am J Obstet Gynecol. 1999; 180 : 1297-302
24. Bayley JP, Ottenhoff H. M., Verweij C. L. **Is there future for TNF promoter polymorphisms?** Genes and Immunity 2004 5(5): 315-329.
25. McGuire W, Hill AV, Aihoff C. E., Gerenwood BM, Kajalowski D. **Variation in the TNF α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.** Nature. 1994; 371 : 508-11.
26. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Casiers M, Coomit J et al. **Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis.** J Exp Med. 1995; 181 : 1256-64.
27. Vera M , Cave J, Henry M, Morgan K, O'Connor M, et al. **A polymorphism in the tumor necrosis factor gene promoter may predispose to a poor prognosis in COPD.** Chest. 2000, 118 (4): 971-75.
28. Goldfeld A, Delgado J, Thim S, Bozon M, Uglialoro A, Turbay D et al. **Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis.** JAMA. 1998, 279 (21):226-28.
29. Etsuro Y, Akihida I, Nobuyuki H, Yoshikaza K. **The gene polymorphism of tumor necrosis factor beta, but not alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis.** Chest. 2001, 119 (3): 753-61.
30. Pociot F, Briant I, Jongeneel CV. **Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by non mononuclear cells. A possible link insulin-dependent diabetes mellitus.** Eur J Immunol. 1993; 23 : 224-31
31. Arias AI, Giles B, Elermann TH, Sterry W, Pandey JP. **Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in psoriasis.** Exp Clin Immunogenet. 1997; 14 (2):118-22.
32. D' Auria L, Bonifati C, Mussi A, D' Agosto G, De Simone C, Glacalone B et al. **Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity.** Eur Cytokine Netw. 1997; 8 (4): 383-87.

33. Wang Y, Zhang Y, Zhu S. **The association of susceptibility of SLE and the gene polymorphism of TNF.** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1998; 78 (2) : 111-14.
34. Pandey JP, Takeuchi F. **TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in systemic sclerosis.** *Hum Immunol.* 1999 ; 60 (11) : 1128-32
35. Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. **Variation in the Tumor Necrosis Factor- α Gene Promoter Region May Be Associated with Death from Meningococcal Disease.** *J Infect Dis.* 1996 ; 174 :878-80.
36. Conway DJ, Holland MJ, Bailey RL, Campbell AE, Mahdi OS, Jennings R et al. **Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter and with elevated TNF-alpha levels in tear fluid.** *Infect Immun.* 1997 ; 65 (3) : 1003-36.
37. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CGN, Saha B, Hazra SK, Hill AVS et al. **Tumor Necrosis Factor Promoter Polymorphism and Susceptibility to Lepromatous Leprosy.** *J Infect Dis.* 1997. 176: 510-12.
38. Nuntayanuwat S, Dharakul T, Chaowagul W, Songsivilai S. **Polymorphism in the promoter region of tumor necrosis factor-alpha gene is associated with severe melioidosis.** *Hum Immunol.* 1999; 60 (10) : 979-83.
39. Schade FU, Stuber F, Borgermann J, Majetschak M. **Relation of the bi-allelic fragment length polymorphism within the tumor necrosis factor B gene to the development of mediastinitis** *Eur J Surg Suppl.* 1999; 55 (584) : 73-78.
40. Takeuchi K, Majima Y, Sakakura Y. **Tumor necrosis factor gene polymorphism in chronic sinusitis.** *Laryngoscope.* 2000; 110 (10 Pt 1) : 1711-14.
41. Debets JM, Kampneijer R, van der Linden MP, Buurman WA, van der Linden CJ, Buurman WA et al. **Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients.** *Crit Care Med.* 1989; 17 (6): 489-94.
42. Surkova L, Paniutch A, Shpakovskaia N. **Role of tumor necrosis factor in immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis.** *Probl Tuberk.* 1993, (4):2-4.
43. Thomas C, Tsao M, Ji-hong H, Li.Fu L, Meng-Jer H, Shuen-Kuei L, et al. **Imbalances between tumor necrosis factor α and its soluble receptor forms, and, interleukin- 1β and interleukin-1 receptor antagonist in BAL fluid of cavitory pulmonary tuberculosis.** *Chest.*2000,117 (1):103-09.

44. Bekker L, martens G, Ateyn L, Kaplan G. **Selective increase in plasma tumor necrosis facto- alpha and concomitant clinical deterioration after iniciating therapy in patients with severe tuberculosis.** J Infect Dis. 1998, 178(2):580-84.
45. Peng Y, Jia H, Wu Y. **Evaluating clinical significance of tumor necrosis factor. Alpha and hydroxiprolin in blood of patients with active pulmonary tuberculosis.** Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 1997, 20(5):305-06.
46. Kim S, Kim H, Lee Y, Kim S. **Production of tumor necrosis –factor-alpha by alveolar macrophages from patient with pulmonary tuberculosis.** J Korean Med. Sci. 1991, 6 (1):45-53.
47. Nakaya M, Yoneda T, Yoshikawa M, Tsukeguchi K, Tokuyama T, Fu A et al. **The evaluation of interleukin.8 (IL-8) and tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) level in peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis.** Kekkaku 1995 , 70(8):462-26.
48. Dlugovitzky D, Bay M, Rateni L, Fiorenza G, Vietti L, Farroni M, et al.. **Influence of diseases severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (Tb).** Clin Exp Immunol.2000, 122(3): 343-49.
49. Baena A, Leung J, Sullivan A, Landires I, Vasquez-Luna N, Quiñones-Berrocal J et al. **TNF alpha, promotor single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry.** Genes and immunity.2002, 3 : 482-87.
50. Koeger KM. **Impact of the -308 TNf promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the gene: relevance to disease .** J Leuc Biol 1999.66(4): 562-566.
51. Sanchez-Castillo C, Velazquez-Monroy O, Lara-Esqueda A, Berber A, Sepúlveda J, Tapia-Conyer R, James W. **Diabetes and hypertension increases in a society with abdominal obesity: results of the Mexican National Health Survey 2000.** Public Health Nutrition. 2005 8(1): 53-60.
52. Madero MA, García-Alvarez E. R.; Velasco-Rodriguez V. M.; Violante-Ortiz R. M. **Lower Prevalence of Diabetes Mellitus (DM) in Marginated Rural Communities Compared to Rural Regions Nearest to Urban Area in Northern Mexico. Analysis of Risk Factors.** Diabetes 2004 S 53: A526-A 532.

53. Kubaszek A, Pihlajamaki J, Komarovski V, Lindi V, Lindstrom J, Eriksson J, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S. **Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study.** *Diabetes.* 2003 Jul; 52(7):1872-6.
54. Li H, Groop L, Nilsson A, Weng J, Tuomi T. **A combination of human leukocyte antigen DQB1*02 and the tumor necrosis factor alpha promoter G308A polymorphism predisposes to an insulin-deficient phenotype in patients with type 2 diabetes.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jun; 88(6):2767-74.
55. Kankova K, Marova I, Jansen EH, Vasku A, Jurajda M, Vacha J. **Polymorphism Nco1 in tumor necrosis factor B is associated with fasting glycemia and lipid parameters in healthy non-obese Caucasian subjects.** *Diabetes Metab.* 2002 Jun; 28(3):231-7.
56. Kankova K; Muzik J; Karaskova J; Beranek M; Hajek D.; Znojil V et al. **Duration of non-insulin dependent diabetes mellitus and the TNF-beta NCo1 genotype as predictive factors in proliferative retinopathy.** *Ophthalmologica* 2001. 215 (4): 294-298.
57. American Thoracic Society, **Diagnostic Standards and classification of tuberculosis in adults and children.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 161: 1376-81.
58. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la **prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.** Modificada el 31 octubre del 2000.
59. Diccionario Mosby. **Medicina Enfermería y Ciencias de la Salud,** CD ROM
60. Norma Oficial Mexicana para la **Disposición de sangre Humana y sus Componentes con fines terapéuticos** México DOF 1993.
61. Gorodezky L C, Alaéz C. **Extracción y purificación del DNA. Manual de Procedimientos de Genética Molecular.** Depto. Inmunogenética. INDRE. México 2004.

62. Marmur J, Kirby K. **SS Phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.** P 16-21. Davis L, Kueb M. Batten J. Basic methods in molecular biology. 1994, 2da. Edit.
63. Marmur J, Kirby K. **UV and fluorescence spectroscopy for determining DNA/RNA concentration.** P 22-24. Davis L, Kueb M. Batten J. Basic methods in molecular biology. 1994, 2da. Edit.
64. Browner, Black D, Newman T, Hulley B. Estimación del tamaño de la muestra y la potencia. P 153-66. Hulley B. Diseño de la investigación clínica. 2da Edic Año 1997.
65. Hoffmann, Steven C. a; Stanley, Eran M. a; Cox, E. Darrin b; DiMercurio, Barbara S. a; Koziol, Deloris E. c; Harlan, David M. a; Kirk, Allan D. a; Blair, Patrick J. **Ethnicity Greatly Influences Cytokine Gene Polymorphism Distribution.** American Journal of Transplantation. 2002; 2(6):560-7.
66. Koch M, Rett K, Volk A, Maerker E, Haist K, Weisser M, Rettig A, Renn W, Haring HU. **The tumor necrosis factor alpha -238 G --> A and -308 G --> A promoter polymorphisms are not associated with insulin sensitivity and insulin secretion in young healthy relatives of Type II diabetic patients.** Diabetologia.2000 Feb; 43(2):181-4.
67. Ishii T; Hirose H; Saito I; Nishikai K; Maruyama H; Saruta T. **Tumor necrosis factor alpha gene G-308-A polymorphism, insulin resistance, and fasting plasma glucose in young, older, and diabetic Japanese men.** Metabol 2000 49(12):1616-8.
68. Wybranska, Iwona *; Malczewska-Malec, Malgorzata; Niedbal, Sylwia; Naskalski, Jerzy W.; Dembinska-Kiec, Aldona. **The TNF-[alpha] Gene Nco1 Polymorphism at Position -308 of the Promoter Influences Insulin Resistance, and Increases Serum Triglycerides after Postprandial Lipaemia in Familiar Obesity.** Clinical Chemistry & Laboratory Medicine. 2003, 41(4):501-510.
69. Shiau MY, Wu CY, Huang CN, Hu SW, Lin SJ, Chang YH. **TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients.** Tissue Antigens. 2003 May; 61 (5):393-7.

70. Furuta M, Yano Y, Ito K, Gabazza EC, Katsuki A, Tanaka T, Ohtake K, Hirata N, Hori Y, Araki-Sasaki R, Sumida Y, Adachi Y. **Relationship of the tumor necrosis factor-alpha -308 A/G promoter polymorphism with insulin sensitivity and abdominal fat distribution in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus.** *Diabetes Res Clin Pract.* 2002 May; 56(2):141-5.
71. Shiau MY, Wu CY, Huang CN, Hu SW, Lin SJ, Chang YH. **TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients.** *Tissue Antigens.* 2003 May; 61(5):393-7.
72. Kankova K, Marova I, Jansen EH, Vasku A, Jurajda M, Vacha J. **Polymorphism Nco1 in tumor necrosis factor B is associated with fasting glycemia and lipid parameters in healthy non-obese Caucasian subjects.** *Diabetes Metab.* 2002 Jun; 28(3):231-7.
73. Laniado-Laborín R; Cabrales-Vargas N. **Tratamiento acortado estrictamente supervisado: Estrategia necesaria, pero no suficiente para controlar la tuberculosis en Baja California, México.** *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2000 13(1):23-27.
74. Frothingham R. **Mycobacteria: treatment approaches and mechanism of resistance.** *J Med Liban* 2000 48(4): 248-54.

ANEXO 1

Frecuencia del Polimorfismo genético del Factor de Necrosis Tumoral alfa (-308) y beta (sitio de restricción de NcoI en el primer intrón) en pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento y pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento.

Fecha de llenado _____ UMF _____ No. _____

Nombre del paciente _____ Filiación _____

Edad _____ Sexo _____ talla _____ peso _____

1. ¿El diagnóstico del paciente además de Tuberculosis (TB) ¿Incluye otra patología?

Sí _____ Cual (es) _____
No _____

2. ¿Cómo se realizó el diagnóstico de tuberculosis?

- a) Por baciloscopia y/o cultivo. d) Por cuadro clínico más baciloscopia y/o cultivo.
b) Por Rx más baciloscopia y/o cultivo. e) Por Rx + cuadro clínico + baciloscopia y/o cultivo.
c) Otra forma (especificar) _____

3. Tiempo de Evolución del Diagnóstico a la fecha:

- a.) De 0 a 5 meses.
b.) De 5 a 8 meses.
c.) De 8 a 12 meses.
d.) De 13 a 24 meses.
e.) Más de 24 meses (especificar) _____

4. ¿Qué esquema de tratamiento recibió una vez establecido el diagnóstico?

5. ¿Ha suspendido el tratamiento?

a.) Sí _____ b.) No _____

6. ¿Cuántas veces ha reiniciado el tratamiento?

- a.) Ninguna (1 esquema de tratamiento)
b.) 1 vez (2 esquemas de tratamiento)
c.) 2 veces (3 esquemas de tratamiento)
d.) 3 veces (4 esquemas de tratamiento)
e.) más de 3 (especificar) _____

7. ¿Ha sido dado de alta por curación? a.) Sí _____ Tiempo que duró en tratamiento _____

b.) No _____

8. ¿Ha tenido recaídas? a) Sí _____ ¿Cuántas? _____ b) No _____

9. ¿Ha presentado toxicidad por antituberculosos?

a.) Sí _____ ¿Cual (es)? _____ b.) No _____

10. ¿Que esquema de tratamiento recibe actualmente?

11. ¿Ha recibido TAES? a.) Sí _____ ¿Cuanto tiempo? _____ b.) No _____

12. ¿Resultado del último cultivo?:

- a.) Positivo b.) Negativo c.) Por confirmar

13. ¿Le han hecho estudios de drogoresistencia?

a) No _____ b.) Sí _____ Mencione el resultado _____

Observaciones _____

ANEXO 2

México D. F. a _____ de _____ 200

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente y en pleno uso de mis facultades, Yo.....

.....
doy mi **CONSENTIMIENTO** para participar en el protocolo de investigación titulado: **“Frecuencia del Polimorfismo genético del Factor de Necrosis Tumoral alfa (-308) y beta (sitio de restricción de NcoI en el primer intrón) en pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento y pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento”.**

Registrado ante el comité local de investigación con el número 2001-693-009. El cual se realizará en la Unidad de investigación del Hospital de Infectología del centro médico “La Raza”. La Dra. Guadalupe Carrillo me ha explicado que el objetivo del estudio es conocer la frecuencia del un gen (elemento responsable de la herencia) del factor de necrosis tumoral (una sustancia que puede producir algunos de los síntomas de la tuberculosis, como la fiebre y la pérdida de peso) en los pacientes con tuberculosis pulmonar que no responden al tratamiento, en los que sí responden y en personas sanas, la información que se obtenga de mi participación será manejada de manera confidencial, el estudio no tiene costo alguno para mí o mis familiares, y no interferirá con mi tratamiento. Consiste en la toma de una muestra de sangre de mi brazo, por personal capacitado y cuyos riesgos se me explicaron (hematoma, infección, flebitis, etc.), además debo contestar unas preguntas referentes a mi padecimiento. Es posible que no se produzca beneficio directo o a corto plazo para mí. Mi participación en este estudio es enteramente voluntaria, se respetará mi decisión, sin que por ello se me niegue el servicio o se me condicione.

Nombre y firma del Paciente

Nombre y firma del Médico

Testigo

Testigo

Dra. Gpe. Carrillo M. Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología
CMNR Tel.: 5724-5900 Ext. 23972.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité Académico de las Ciencias Médicas, del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, según acuerdo AA7(CM/SCA/SO59/05) acordó designar y se formaliza por el Comité Académico del Programa, el jurado para el examen de grado de Maestra en Ciencias, (Plan 4006) de la C. Ma. Guadalupe Carrillo Montes, quien defenderá la tesis denominada "Frecuencia del Polimorfismo genético del Factor de Necrosis Tumoral alfa (-308) y beta (sitio de restricción de Nco1 en el primer intrón) en pacientes con tuberculosis pulmonar sin respuesta al tratamiento y pacientes con tuberculosis pulmonar con respuesta al tratamiento".

PRESIDENTE	DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO
SECRETARIO	DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
VOCAL	DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA
SUPLENTE	DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
SUPLENTE	DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria D. F., a 7 de abril de 2005.


DR. LUIS FELIPE ABREU H.
El Coordinador

NOTA: Por acuerdo del Subcomité Académico, la formalización de este Jurado de Examen de Grado, tiene una vigencia de 6 (seis) meses a partir de la fecha de aprobación del mismo. Excedido el tiempo, el alumno deberá someter a consideración del Subcomité Académico una nueva propuesta de jurado.

LFAH/AFSI/ME/BU yaz



COORDINACION DEL PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DR. LUIS FELIPE ABREU HERNÁNDEZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA
Presente

Informo a usted que después de haber revisado la tesis titulada:

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENETICO DEL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL ALFA (-308) Y BETA (SITIO DE RESTRICCIÓN DE NCOI EN
EL PRIMER INTRON) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR SIN
RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR
CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

del (la) alumno (a), MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES

candidato (a) al grado de MAESTRA EN CIENCIAS

He considerado procedente emitir una opinión FAVORABLE en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado correspondiente.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 2 de MAYO

de 2005.


DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO.

Anexo observaciones: (SI) (NO)



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DR. LUIS FELIPE ABREU HERNÁNDEZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA
Presente

Informo a usted que después de haber revisado la tesis titulada:
FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL ALFA (-308) Y BETA (SITIO DE RESTRICCIÓN DE NCO1 EN
EL PRIMER INTRON) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR SIN
RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS
PULMONAR CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO.
del (la) alumno (a), MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES
candidato (a) al grado de MAESTRA EN CIENCIAS
He considerado procedente emitir una opinión favorable en términos de que la
tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado
correspondiente.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 25 de ABRIL

de 2005.

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO

Anexo observaciones: (Si) (NO)



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DR. LUIS FELIPE ABREU HERNÁNDEZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA
Presente

Informo a usted que después de haber revisado la tesis titulada:

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL FACTOR DE NECROSIS

TUMORAL ALFA (-308) Y BETA (SITIO DE RESTRICCIÓN DE NCO1 EN
EL PRIMER INTRON) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR SIN
RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS
PULMONAR CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

del (la) alumno (a), MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES

candidato (a) al grado de MAESTRA EN CIENCIAS

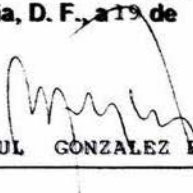
He considerado procedente emitir una opinión FAVORABLE en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado correspondiente.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 19 de MAYO

de 2005.


DR. CESAR RAUL GONZALEZ BONILLA

Anexo observaciones: (Sí)

~~(NO)~~



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DR. LUIS FELIPE ABREU HERNÁNDEZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA
Presente

Informo a usted que después de haber revisado la tesis titulada:
FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL FACTOR DE NECROSIS

TUMORAL ALFA (-308) Y BETA (SITIO DE RESTRICCIÓN DE NCOI EN
EL PRIMER INTRON) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR SIN
RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR
CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

del (la) alumno (a), MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES

candidato (a) al grado de MAESTRA EN CIENCIAS

He considerado procedente emitir una opinión FAVORABLE en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado correspondiente.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 11 de MAYO

de 2005.

DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

Anexo observaciones: (SI) (NO)



COORDINACION DEL PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DR. LUIS FELIPE ABREU HERNÁNDEZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA
Presente

Informo a usted que después de haber revisado la tesis titulada:

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL ALFA (-308) Y BETA (SITIO DE RESTRICCIÓN DE NCO1 EN
EL PRIMER INTRON) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR SIN
CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR
CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

del (la) alumno (a). MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES

candidato (a) al grado de MAESTRA EN CIENCIAS

He considerado procedente emitir una opinión FAVORABLE en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado correspondiente.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 1 de MAYO

de 2005.

DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE

Anexo observaciones: (Si)

(NO)