

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**



**División de Estudios de Posgrado e Investigación
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud**

**Sede Académica: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la
Nutrición "Salvador Zubiran"**

**Sede del Proyecto: Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio
Chávez"**

Título

**DETECCION E IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS Y
SECUENCIAS DE GENES ASOCIADOS A
Mycobacterium tuberculosis y *bovis*
EN AORTA DE PACIENTES CON ARTERITIS DE TAKAYASU.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS MEDICAS**

PRESENTA

DRA. MARIA ELENA SOTO LOPEZ

**TUTORES DE TESIS: DRA. MA. DEL CARMEN AVILA CASADO
DR. PEDRO A. REYES**

**CO-TUTORES Y ASESORES: DRA. CLAUDIA HUESCA GOMEZ
DR. RICARDO GAMBOA AVILA**



México D.F Agosto de 2011



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.

Dra. Ma. Del Carmen Ávila-Casado
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Investigador en Ciencias Médicas D SIN I
Jefa del Departamento de Patología
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Pedro A. Reyes López
Director de Investigación
Investigador en Ciencias Médicas "F" SNI III
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Claudia Huesca Gómez
Investigador en Ciencias Médicas "C" SNI I
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
Doctorado en Ciencias en el
Instituto Catalán de enfermedades cardiovasculares

Ricardo Gamboa Ávila
Investigador en Ciencias Médicas "D" SNI I
Departamento de Fisiología
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
Doctorado en Ciencias Médicas
Universidad de Washington Seattle WA. USA

INDICE

	Páginas
Resumen	I, II, III
1. Marco teórico	1 -10
2. Antecedentes	11
2.1 Históricos	11
2.2 Epidemiología	12
2.3 Etiopatogenia	12
2.4 Inmunogenética	12 – 13
2.5 Criterios de Clasificación	14
2.6 Clasificación de la lesión arterial	14-15
2.7 Métodos Diagnósticos	15- 16
2.8 Tratamiento	17 – 18
3. Planteamiento del problema	19
4. Pregunta de Investigación	19
5. Justificación	19 - 20
6. Factibilidad	20
7. Objetivo General	20
8. Objetivos Específicos.	20
9. Objetivos secundarios	20 - 21
10. Hipótesis	21
10.1 Nula	21
10.2 Alterna	21

11. Metodología	21
11.1 Tipo de estudio	21
11.2 Diseño	21
11.3 Tipo de muestreo	21 - 22
11.4 Selección de casos y controles	22 - 23
11.5 Casos identificados	23 - 24
11.6 Criterios de Inclusión	24
11.7 Criterios de Exclusión	24
11.8 Criterios de Eliminación	24
11.9 Tamaño de muestra	24
11.10 Calculo de Tamaño de muestra	25
11.11 Poder de la muestra	25
12. Definición de las variables de estudio	26
12.1 Variables independientes	26
12.2 Variables dependientes	27
12.3 Asociación y posible confusión y modificación de efecto	27
12.4 Otras variables	27
13. Aspectos éticos	28
14. Universo	28
15. Control de procedimientos	28
15.1 Muestra de Mico bacteria H37Rv	28
15.2 Obtención del tejido	28
15.3 Extracción del DNA de tejidos embebidos en parafina	29
15.4 Amplificación del DNA	29 - 30
15.5 Protocolo de PCR Amplificación <i>M tuberculosis</i> gen <i>IS6110</i>	30

15.6	Protocolo de PCR Amplificación <i>M. Bovis</i> gen <i>HupB</i>	30
15.7	Daño Histológico	31
16.	Análisis estadístico	31
17.	Cronograma de actividades	32 - 33
18.	Resultados	34 – 55
19.	Discusión	56 – 61
20.	Conclusión	61
21.	Referencias bibliográficas	62 – 77
22.	Anexos	78

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a Jehová mi Dios.

Él me conoce y ha permitido este momento.

Él conocía desde antes quienes serian mis padres, hermanos, esposo, mis hijos, amigos, compañeros de trabajo.

En mi formación dispuso a los Maestros, los que me educaron en la infancia hasta los que ahora participan en mi formación Universitaria. (Dra. Florencia Vargas V, Dra. Ma. Del Carmen Ávila Casado, Dr. Pedro A. Reyes, Dra. Claudia Huesca-Gómez, Dr. Ricardo Gamboa,)

Las personas con quienes he convivido en esta vida no fueron por el Azar ni por una probabilidad estadística. Dios lo quiso así para que yo aprendiera algo de cada uno.

Como todo humano acepto que muchas veces le fallé y consciente estoy que no soy el mejor ejemplo para quienes me conocen, pero sé que Dios conoce mi corazón y sabe que me he esforzado por tratar de ser mejor, pues la meta más importante en mi vida es conocerlo. Tengo presente que sus caminos no han sido siempre los que yo quería seguir, sin embargo fueron trazados y vigilados por Él porque me ama y tal vez porque de ésta manera es donde yo podía servirle.

A Dios le agradezco:

Mis hijos, los que ahora duermen y por los cuales le he pedido perdón por haberle fallado. Sé que en su misericordia me dio una nueva oportunidad con Melina y David, el valor de ese regalo, lo llevo en mí todo el tiempo, pues el amor de un hijo, significa tener ese amor inexpresable que cura cualquier dolor en este mundo y que Jehová mismo conoce en su hijo Jesús.

Mis amigos Israel, Claudia y Abel para quienes pido bendigas siempre.

Su creación se conoce con perfección y en ella me ha permitido investigar algunos aspectos de enfermedades cuya etiología pueden ser demasiado complejas. Se que El tiene la clave, por lo que puedo valorar el valor de su Obra.

En este estudio hemos concluido que la arteritis de Takayasu puede ser consecuencia de infección por *M tuberculosis*. Tuberculosis como tal es conocida como “consumo”, desde mucho antes de nuestro tiempo. Levítico 26:16 Deuteronomio 28:22 (Cardiovascular Infectious disease 1999; 29 y Bull. N.Y Acad Med 1977; 604-608

Reconozco mi ignorancia y limitación al tratar de saberlo todo. Ma. Elena

AGRADECIMIENTOS

En especial agradezco a mis amigos, los Dres. Claudia Lerma González y Abel Lerma Talamantes, por su amistad incondicional, dispuestos en todo momento a mejorar la calidad y contenido de mi tesis, por su gran calidad humana. Los quiero mucho.

A la Dra. Florencia Vargas Vorackova, quien en su papel de Maestra y del programa Académico, ha sido un pilar muy importante en mi formación para el alcance de este logro. La Admiro.

Al Dr. Ulloa a quien también admiro y respeto profundamente, clave en el sueño que todos tenemos para alcanzar la excelencia. Su crítica en el proyecto tiene bases formativas que deben ser bien reconocidas por nosotros sus alumnos.

A todos mis Profesores del Posgrado por apoyarme con su conocimiento para mi formación Académica.

A la Dra. Ma. Del Carmen Ávila Casado, por creer en mí y darme el apoyo necesario para que los casos de este Proyecto fueran cuidadosamente seleccionados. Ella en su papel de Jefa del Departamento dio su consentimiento y aceptación a mi trabajo dentro de su Área, actualmente, ella ha emprendido nuevas Metas para lo cual le deseo de todo corazón lo mejor a ella y su familia.

Al Dr. Pedro A Reyes, agradezco su apoyo para emprender este proyecto, su conocimiento sobre el tema y su experiencia como Investigador consolidado. Le agradezco mucho su paciencia para entenderme y soportarme pero sobre todo por su amistad.

A los Dres. Claudia Huesca-Gómez, Ricardo Gamboa y Vicente Castrejon, por ofrecerme el apoyo fundamental de este trabajo con sus conocimientos de Biología Molecular

Al Departamento de Informática, en especial a Julio y Víctor, por su disposición para auxiliarme en todas mis deficiencias en computación.

A las señoritas Marilú Hernández y Rosario Soriano por auxiliarme en mis trabajos alternos en su capacidad de Secretarias y con ello poder dedicarle más tiempo a este trabajo.

A mis hijos a quienes tanto amo, por su paciencia, por el tiempo que me cedieron para el logro de esta meta, por su compañía misma la cual me ha llenado de gran felicidad y fuerza en todo momento. Es una bendición que nunca olvido.

A mis padres y hermanos. Se que no hay nada por lo que ustedes puedan sentirse orgullosos de mí, mas sin embargo, deben saber que los amo y que me he esforzado en mi vida para no herirlos o ser un mal ejemplo, perdonenme si he fallado alguna vez.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

A mi casa de Estudios, mi muy querida Universidad Nacional Autónoma de México, donde he recibido mi formación Académica y de la cual me siento muy orgullosa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo financiero en este Proyecto.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado y todo su personal que contribuye a las bases Administrativas y de Logística. Por su atención siempre amable y dispuesta a apoyarnos en los aspectos necesarios para los requerimientos que nuestra Universidad solicita.

Al Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutrición Salvador Zubiran, por recibirme y ser aceptada como alumna en su trayecto de Institución con alto prestigio Académico y darme todo el apoyo para mi formación en esta etapa de mi vida.

Al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Institución de Prestigio Internacional quien abrió sus puertas para que yo fuera aceptada para laborar en el Área de Investigación y de la cual he recibido el apoyo para continuar con mis estudios de Grado. (Maestría y Doctorado).

Además agradezco al cuerpo de Gobierno por su preocupación constante para que su personal se mantenga en alcanzar nuevos conocimientos de vanguardia y excelencia.

Resumen.

Antecedentes.

La Arteritis de Takayasu (AT) es un padecimiento inflamatorio crónico que afecta a grandes arterias y las ramas que de ella emergen, progresa a fibrosis y estenosis vascular lo que conlleva a daño en diversos órganos. La causa es aún desconocida y predomina en mujeres.

Durante más de 50 años, se ha buscado una relación de AT con infección por *M. tuberculosis*, debido a que estos pacientes, presentan en ocasiones lesiones granulomatosas en el tejido arterial muy similares a las observadas en tuberculosis y respuesta hiperérgica a la aplicación de la prueba de tuberculina.

Los estudios de esta relación, en su mayoría son anecdóticos, muestran variabilidad metodológica y controversia en los resultados.

Objetivos. Identificación y búsqueda de la presencia de secuencias de los genes asociados a *Micobacterium tuberculosis* en tejido de aortas de pacientes con AT y evaluar asociación de AT con probable infección por *M. tuberculosis*, mediante un estudio sistemático.

Material y Métodos.

La selección de casos con AT con > de 4 criterios, de acuerdo a los criterios del American College of Rheumatology, controles con tuberculosis pulmonar (TBP) confirmada y otro grupo control con daño aórtico por aterosclerosis.

Se cotejaron datos de la historia clínica y de los resultados de autopsia, de los cuales una vez que se confirmó adecuadamente cada fenotipo, para casos y controles, se procedió a buscar los bloques de tejido aórtico embebido en parafina que se hubiesen conservado con técnica de almacenamiento similar.

Se realizó extracción del DNA y la amplificación de 123 pares de bases (pb) del elemento de inserción IS6110 de *Micobacterium tuberculosis*, con los oligonucleótidos:

IS6110 F (5'CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-3') y IS6110 R (CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3') para el gen *HupB* de *M. tuberculosis* y *bovis*.

PCR anidada con Primers iniciadores N y S (5'-GGAGGGTTGGGATGAACAAAGCAG-3') (TATCCGTGTGTCTTGACCTATTTG-3').

La prueba anidada para la región C terminal del gen *HupB* primers:

F (5'CCAAGAAGCGA CAAAGG3') y R (5'-GACAGCTTTCTTGCGGG-3').

Se dio un código para cegar el estudio.

Resultados.

Un total de 119 tejidos: 33 AT, 33 con TB y 53 con aterosclerosis.

Con edad de 22 ± 13 , 41 ± 19 , 57 ± 10 y provenían de zona endémica 52%, 57% y 69% respectivamente.

De los 33 casos con AT el 88% fueron tipo V y en 20% de ellos se confirmó daño oclusivo en arterias coronarias y pulmonares.

En los 33 controles con infección tuberculosa confirmada se encontró que en 19 la localización de la infección fue pulmonar, en 10 pulmonar y extra pulmonar y 4 miliares.

En los controles con aterosclerosis, todos tenían con factores de riesgo coronario, Lesiones estenóticas y/o oclusivas de la pared arterial en AT, TB y aterosclerosis fueron encontradas 52%, 6% y 6% respectivamente ($p=0.0000$) y el infiltrado inflamatorio de 73%, 33% y 27%, fibrosis 66%, 35% y 66% en cada grupo.

El tiempo de almacenamiento del tejido y nivel socioeconómico similar entre At y el grupo con tuberculosis.

El análisis reportado de las secuencias IS6110 y prueba anidada para la detección específica de *M. tuberculosis* alcanzo una correlación interobservador de 94% e intraobservador de 90%.

La identificación de correlación en los resultados tanto de la prueba positiva de la secuencias IS6110 + la prueba anidada para la detección de M. Tuberculosis del (gen HupB), fueron positivas en 70% en AT, 82% en Tb y 36% en aterosclerosis, ($p=0.004$) y $p=0.000$.

Se realizó un análisis por correlación canónica para identificar posibles variables predictivas tales como:

(Nivel socioeconómico, antecedente de contacto con tuberculosos, índice de masa corporal (IMC), estrato de edad y tiempo de evolución de la enfermedad y posibles variables efecto como: (presencia de granulomas, ambas secuencias positivas en la detección de M tuberculosis (IS6110+HupB), tipo de localización de la lesión arterial (intima media adventicia), Sitio e identificación de lesión tuberculosa (pulmonar, extra pulmonar, ambas o miliar), grupo del padecimiento.

La linealidad de relación y correlación fue de 87% Test.Wilkis' Lambda ($p=0.0000$), Test

Roy's largest root ($p=0.0000$), PCR anidada para *M. bovis* fue similar entre casos y controles.

Conclusión. Se identificaron *secuencias IS6110 y del gen HupB* que identifican a *Micobacterium tuberculosis* en tejidos de aorta de pacientes con arteritis de Takayasu. La probabilidad de asociación con infección tuberculosa es significativa y es posible que el daño arterial sea una manifestación extra pulmonar de tuberculosis. Esto permite plantear nuevas hipótesis de estudio y conducir y evaluar manejo terapéutico con antituberculosos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La morbilidad y mortalidad en AT está relacionada a estenosis y/o oclusión arterial, resultado de inflamación crónica, la cual conlleva a fibrosis. La etiología aun es desconocida, se ha informado desde hace más de 5 décadas de una posible relación con infección por *M. tuberculosis*, pero ha habido diversidad en la metodología y las técnicas de apoyo del laboratorio utilizadas para la búsqueda de esa asociación, por lo que los resultados son controversiales. Los estudios en el tejido afectado son pocos, por la dificultad para obtener tejido arterial, lo cual solo es posible en la fase avanzada del padecimiento, donde se requiere de cirugía o del uso de stent endovascular, ambos procedimientos de riesgo y costo elevado. El uso de esteroides e inmunosupresores tiene limitantes y la terapia antituberculosa no está justificada. Se requiere mejorar las estrategias de investigación.

1. Marco teórico

La arteritis de Takayasu (AT) es una vasculitis rara inflamatoria crónica, de etiología aun desconocida (1).

Es frecuente en mujeres jóvenes, la relación M: H en distintas series oscila entre 30:1 y 2:1, en México la relación es de 6:1 (2-4), la distribución es mundial, las manifestaciones clínicas más comunes son: ausencia de pulsos periféricos, diferencias en la presión arterial, soplos en distintas zonas del árbol vascular y signos de insuficiencia arterial regional (5).

En la fase inicial de la enfermedad hay una fase activa inflamatoria y es común observar por estudios de imagen de vanguardia engrosamiento de la pared arterial, sin embargo hay pocos datos clínicos definidos por lo que resulta difícil emitir un diagnóstico. La fase tardía de la enfermedad arterial es mejor reconocida ya que ella se observa la progresión del daño arterial a fibrosis, estenosis y/o oclusión de la aorta y de los vasos que de ella emergen y es común encontrar complicaciones en diversos órganos lo cual disminuye pronóstico y sobrevida (6,7).

Se ha propuesto que la oclusión/estenosis y la progresión de inflamación en la aorta de pacientes con AT, podrían ser el resultado de un proceso infeccioso crónico (8). Diversos hallazgos en la literatura apoyan una relación de AT con infección tuberculosa. Tabla 1

En los modelos animales de vasculitis, inducida por bacterias y virus, han reproducido exitosamente muchos aspectos de las vasculitis en humanos (9-14) y se ha propuesto que en esos modelos, puede encontrarse infección persistente, con una posible interacción crónica entre el patógeno, el tejido infectado y el sistema inmune (15).

Cabe señalar que en los modelos animales para reproducir tuberculosis, no han sido útiles, porque no imitan la vía de infección en el humano (16-20).

La vasculitis en humanos se caracteriza por infiltración inflamatoria idiopática en arterias de todos los calibres, hay signos de activación inmune, inflamación, expansión de subtipos de células T sobre reguladas por moléculas clase I y II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) sin embargo los antígenos responsables para su activación no han sido definidos (21).

Tabla 1

Tipo de estudio	Referencia	Datos relevantes
Serie de casos (18) Autopsias	Rentería VG, Contreras M. Nonspecific aorto-arteritis. Anatomopathological study of 18 cases. Arch Inst Cardiol Mex 1978;48:80-98	Estudio de 18 casos, 11 mujeres 7 hombres, involucro pulmonar y coronario en 33% No se busco asociación
Serie de casos (16) Autopsias	Rose AG, Sinclair-Smith CC. Takayasu arteritis. A Study of 16 autopsy cases Arch Pathol Lab Med 1980;104:231-7	Dieciséis pacientes en un periodo de 26 años, hallazgos placas fibrosas, aneurismas, lesiones coronarias, tuberculosis coexistente en lesiones distantes de arteria en 37.5%
Serie de casos (29) Autopsias	Gustavo Sánchez Torres. Arteritis inespecífica y enfermedad tuberculosa Aspectos clínicos. Archivos del Instituto Nacional de Cardiología 1971;41:255-263	18/29 Mantoux positivo, tipo de tuberculosis pulmonar, pulmonar y cadera y mal de Pott,
Autopsias (43)	Gustavo Sánchez Torres, Rosario Barroso Moguel. Eritema nudoso y eritema indurado de Bazin y su relación con las arteritis inespecíficas. Archivos del Inst Cardiol Mex 1971;41:414-23	1 paciente con eritema indurado y TB pulmonar, 4 con historia de adenopatía cervical y 8 con eritema nudoso y 7 con indurado
Se revisaron 3600 autopsias	Gustavo Sánchez Torres, Raúl Contreras, Rosario Barroso Moguel, Samuel Zajarías, Raymundo Davila, Eulo Lupi Herrera. Adenitis tuberculosa y arteritis de Takayasu Aspectos clínicos y anatomopatológicos Arch Inst Nal Cardiol Mex 1972;42:663-71	7/10 con focos tuberculosos extrarteriales, adenitis tuberculosa en 15%
Serie de casos 6	Shimizu y Sano.	Historia compatible con arteritis tuberculosa
dos casos	kinoshita K	Cambios tuberculoideos en la aorta y sus ramas
un caso	Okuda	pulmonar
un caso	Mouquin MM, Desvignes P, Macrez C, Hatt P, Fanjoux J. Un cas d'obliteration des trois branchz arterielles nees de la crosse aortique. Bull MemSoc Med Hop Paris 1955; 71:1056	Pleuropulmonar
1/10	Birke G., Ejrup B y Olhagen B. Pulseless disease Angiology. 1957;8:433.	Dérmica y ganglionar, debatible
un caso	Fay S y Berezowaki A. Aortic Arch syndrome. Am Heart J 1958; 55:443.	Tuberculosis no relevante como factor etiológico
3 casos	Misra SS., Prakash S y Agrawal PL. Pulseless disease. Takayasu's syndrome. Am. Heart J 1959; 57:177.	Un caso con ganglio cervical.
4 casos	Sen PK, Kinare SG, Kuskar ni TP, y Perulkar GB. Stenosing aortitis of unknown aetiology. Surgery 1962;51:317	Alergia arterial al B de Koch, material histopatológico
8 casos	Nasu T. Pat hology of pulseless disease. Angiology 1963;14:225	Algunos casos pueden ser de etiología tuberculosa, encontró 1 pulmonar 3 pulmonar y otras regiones 4 con otras regiones
12/16	Sen PK Kinase K, Enginner SD y Perulkar GB. The middle aortic syndrome Brit Heart J 1963;25:610	Gangilonar 3 y 9 no especificadas. probable liga etiológica.
2 casos	Arguello SR., Castro VB., Malo JA., Gómez CC., y de la Rosa MJ. Tuberculosis pulmonar y enfermedad de Takayasu Bol Inst Nal Neumol. 1965;10:111	Pulmonar, fenómeno coincidente
2 casos	Takezawa H, Sakakura M, Kotan Y, Hamaguchi Y; Report of two cases of Takayasu's disease complicated with tuberculide like exanthemas Jap Circulation J;1966;30:1045	Dérmica, alergia arterial s un foco tuberculoso.
1 caso	Thiffault CR. y Smith SP. Extra pulmonary tuberculosis with erythema nodosum and occlusive arterial disease. Canad	Alergia arterial al bacilo de Koch

Aunque se ha propuesto que una variedad de patógenos podrían ser capaces de inducir vasculitis y dar manifestaciones patológicas muy similares entre algunas enfermedades del humano (10,22), en AT hay otros factores que pudieran interaccionar para el daño arterial tales como la estructura tubular de la aorta, la cual tiene variaciones inherentes en su contenido y regionales dentro de la pared vascular, que muestran diferencias entre la aorta torácica y abdominal, en la aorta torácica hay mayor grosor y diámetro (23), presencia de aneurismas (24,25) y el daño arterial, se caracteriza por inflamación en la adventicia y necrosis quística de la pared, mientras que en la región abdominal generalmente se encuentra atero/arteriosclerosis en la intima (26).

Existen también diferencias en el patrón de la enfermedad vascular que pueden estar relacionadas con el tipo de perfusión del tejido (23,27). Por otro lado, en cuanto a la embriogénesis, se ha encontrado en modelos animales que las células de la cresta neural contribuyen a la formación de células del músculo liso en el tronco aórtico, arco proximal y tronco de la arteria pulmonar pero no en las partes más distales de la aorta, en donde las células del músculo liso son derivadas del mesodermo.

Estas diferencias básicas implican que programas genéticos únicos que pueden ser responsables de las respuestas variables de células del músculo liso a la estimulación con citocinas en el hospedero (28) y las del posible patógeno, el cual también tiene sistema de adaptación al medio ambiente en el hospedero, lo cual está mediado por genes represores y activadores, que le permiten al bacilo sobrevivir y tener éxito en la evasión a la acción bactericida del macrófago (29,30).

Otros factores implicados en la respuesta del hospedero tienen relación con el ambiente y en ello hay que considerar: exposición al microorganismo, riesgo de transmisión (31,32), cantidad del inóculo y virulencia del patógeno (33).

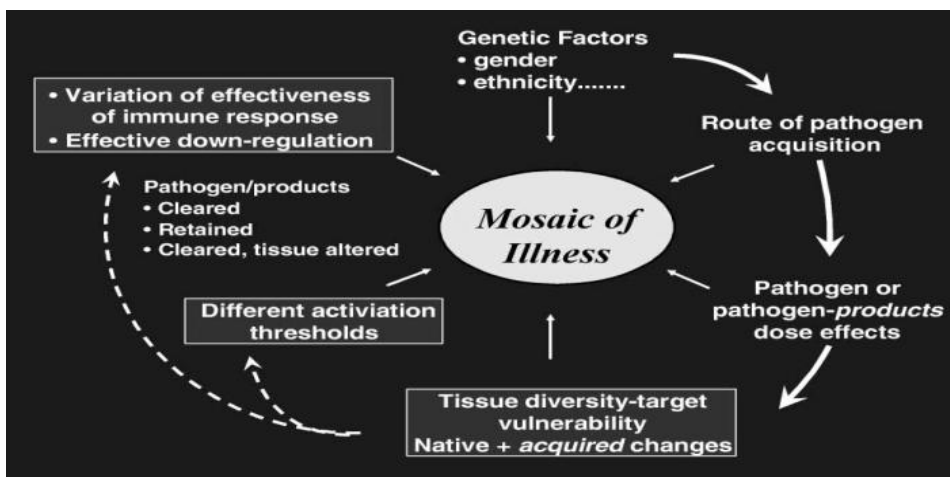
La posible participación de una infección no confirmada en AT, arteritis de células gigantes y aortitis idiopática ha sido propuesta con gran controversia en los resultados, no obstante que en otro grupo de infecciones se conoce que la aortitis es el resultado de una exposición a infección por estafilococo Áureos, Salmonella, hongos, tuberculosis y otros organismos (34).

En teoría, se conoce que los patógenos poseen moléculas de adhesión selectivas y pueden producir productos únicos, con afinidades al tejido muy específicas, lo que podría contar para el tipo de expresión de la enfermedad y de los diferentes resultados y

diferencias funcionales en el órgano afectado así para actuar en sitios remotos a su origen en ausencia del patógeno mismo, donde la respuesta del sistema inmune puede ser incapaz para depurar el agente agresor o para regular la respuesta inflamatoria, lo que explicaría el amplio rango de resultados observados después de una variedad de infecciones. (7,35).

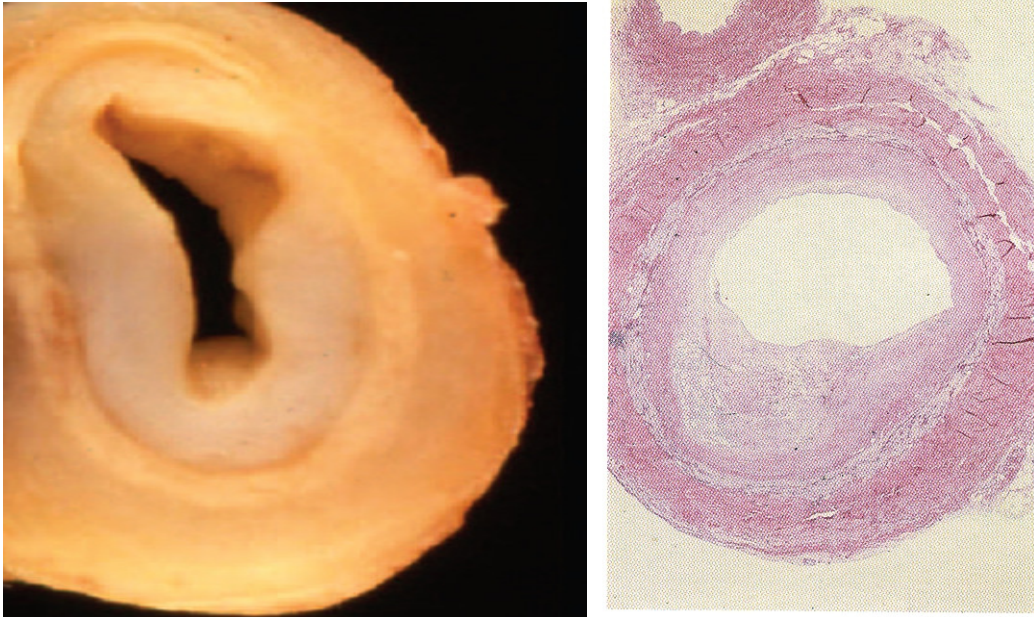
Esto permite proponer que en las enfermedades complejas, aunque existe susceptibilidad genética, otros factores contribuyen a la expresión de la enfermedad y no están relacionados principalmente con el hospedero (36). Figura 1

Figura 1



La patología en AT está localizada en el espesor del vaso en la adventicia, los cambios inflamatorios inician en la vasa vasorum (vasa vasoritis), la inflamación progresa de la adventicia a la capa intima, en la media dominan las lesiones con infiltración mononuclear y granulomas mal definidos, el endotelio suele ser normal por mucho tiempo, hasta que la aterosclerosis lo modifica (37).Figura 2

Figura 2



En AT se ha informado una relación con infección por *M. tuberculosis*, debido a que en los pacientes se ha encontrado una respuesta incrementada a la aplicación de PPD (38-40), Figura 3, así como lesiones granulomatosas en los vasos afectados (41,42), muy similar a la que se observa en pacientes con tuberculosis, o bien, la presencia de eritema indurado de Bazin (43) y ganglios linfáticos comprometidos (44).

Figura 3



La posibilidad de que esta vasculitis sea una expresión extra pulmonar de tuberculosis es probable, pues se conocen las estrategias de evasión de *M. tuberculosis* dentro del hospedero, que le permiten llegar a diferentes tejidos con gran variabilidad en la expresión clínica (45,46).

Sólo una fracción de los infectados, del 5 a 10%, desarrolla la enfermedad, en la mayoría hay una infección latente de por vida y solo en circunstancias de deficiencia inmune se expresa la enfermedad y adopta diversas formas de expresión clínica; sin embargo, la más común es la de localización pulmonar (47,48). La enfermedad extra pulmonar puede ocurrir por vía hematogena (49) y se encuentra con frecuencia en ganglios linfáticos, serosas-pleura, peritoneo, cerebro, riñones hueso y piel (50).

En los casos con infección latente la reactivación ocurre cuando hay inmunosupresión (51) en ciertos grupos de edad, o por coexistencia con otras enfermedades (52-54).

Se ha propuesto también que un perfil genético en el hospedero y podría determinar actividad y expresión de la enfermedad (55,56).

En relación a *M. tuberculosis*, se conoce que en la patogenia de tuberculosis pulmonar el bacilo no elabora endotoxinas ni exotoxinas, la destrucción de los tejidos son ocasionadas por productos que elabora el hospedero durante la respuesta inmunitaria a la infección (16) donde hay respuesta inflamatoria incrementada con gran participación celular, susceptibilidad a enfermedad relacionada con genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y fibrosis en los tejidos, estas características son también observadas en AT.

Recientemente se ha demostrado la capacidad de la bacteria para adaptarse a diversos ambientes del hospedero durante la progresión de la enfermedad, latencia y reactivación

(51) y en los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se han identificado 13 factores sigma de los cuales 3 se han señalado con capacidad de respuesta ante los cambios ambientales que probablemente ocurren durante la adaptación del bacilo y que conllevan a que se mantenga una infección latente (57) .

También es conocido que en tuberculosis pulmonar se encuentra en ocasiones una lesión en los vasos cercanos a las cavitaciones que ha sido descrita como aneurisma de Rasmussen (58), la cual es una forma de arteritis en la pared de la cavitación que en

ocasiones es fuente de hemoptisis. Hasta el momento actual no hay estudios de seguimiento en pacientes con tuberculosis, para evaluar si desarrollaron arteritis.

Es conocido también que hay al menos más de 50 casos raros de reportes aislados cuyos hallazgos relevantes se describen durante el procedimiento quirúrgico, como son los pseudoaneurismas tuberculosos con daño aórtico, muy parecidos a los reportados en AT y que son de mal pronóstico y reportes con lesión vascular secundaria a tuberculosis en el abdomen (59-61).

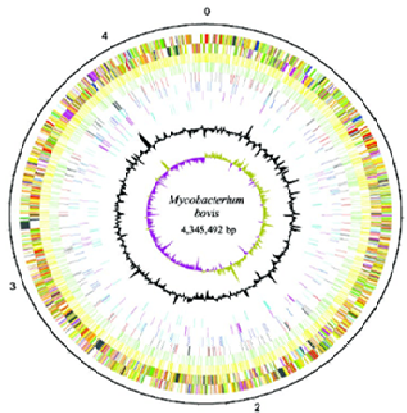
Por todo esto es posible considerar que la relación informada sobre tuberculosis y AT puede ser factible.

Actualmente las técnicas diagnósticas disponibles para identificar *M. tuberculosis*, se apoyan en estudios moleculares, a los cuales se les ha encontrado extensa aplicación debido a que existe un conocimiento más amplio del genoma de *M. bovis y tuberculosis* y es posible integrar esta metodología a un régimen sistemático de estudio en pacientes con AT, lo cual puede ser útil en la búsqueda de su posible asociación con tuberculosis.

El mapa integrado de la cepa muestra un cromosoma circular de 4.4 mega bases (62,63), con alto contenido de G+C (>65%).

Hay 50 genes relacionados a la estabilidad del RNA(64), Dieciséis copias de Secuencias de inserción IS6110 y 6 copias de IS1081 y de otras familias IS3, IS256, IS1561 e IS1552. e IS 1532, este último es el único que ha mostrado una variabilidad significativa y las demás secuencias de inserción se conocen estables, tiene genes codificando proteínas en un total de 3924 con marcos de lectura abiertos, contando con más del 91% de capacidad (30,65).Figura 4

Figura 4



Genoma de *Mycobacterium bovis*

Garnier *et al.* PNAS June 24, 2003 vol. 100 no. 13 MICROBIOLOGY

Table 1. Overview of genome comparison

Feature	<i>M. bovis</i> AF2122/97	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551
Genome size, bp	4,345,492	4,411,532	4,403,836
G + C, %	65.6	65.6	65.6
Protein coding genes*	3,951	3,995	4,249
Compared to <i>M. bovis</i>			
SNPs	–	2,437	2,423
Transitions	–	1,649	1,630
Transversions	–	788	793
Deletions (≥ 1 bp)	–	205	221
Insertions (≥ 1 bp)	–	177	245

*The increased number of potential protein coding genes in CDC1551 is caused by the use of a different gene prediction algorithm.

Se ha propuesto que aunque *M. tuberculosis* tiene una transferencia del material genético horizontal (66,67), esto ocurre antes de que el bacilo adopte cambios una vez que se encuentra en el nicho intracelular en donde involucra genes que intervienen con el metabolismo del hospedero y que participan en la resistencia a drogas, regulación de señal de la transducción, metabolismo de lípidos y biosíntesis de ácidos grasos(30). El análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's) de la secuencia de inserción IS6110, fueron descrito por primera vez en *M. tuberculosis* en 1990 (65,68).

Este elemento igualmente está presente en el genoma de otros miembros del complejo *M tuberculosis* (69), lo que sugiere que el elemento de inserción IS6110 es un precursor ancestral del microorganismo, por lo que la técnica permite diferenciar género. La existencia de elementos del DNA repetitivos en *M tuberculosis* y su potencial uso como huella digital de aislados de *M tuberculosis* fueron reconocidos en 1988 por Eisenach (70-

72).

La secuencia de uno de estos elementos designado como IS 6110, se reportó primero por Thierry en 1990 y se mostró relacionada a la familia de secuencia de inserción IS3. Su utilidad ha sido probada (73).

Por otro lado, debido a un alto grado de variabilidad en las características del fenotipo, han llevado al desarrollo de elaborar técnicas confiables, para distinguir entre miembros del complejo *M. tuberculosis* y *bovis* basadas en la amplificación de secuencias del DNA de micobacterias y para la detección de especímenes de *M. tuberculosis* (74-85), secuencias de inserción IS6110, IS990 e IS1081 (86-89), todos estos son, diversos blancos que han sido considerados como pruebas diagnosticas algunas con grandes limitantes pues analizan la muestra de forma cualitativa.

Para demostrar diferencias entre especies, existen marcadores genéticos alternativos y pruebas bioquímicas las cuales han sido usadas para diferenciar entre *M. tuberculosis*, *M. bovis*., *M. africanum*., *M. canetti* (90).

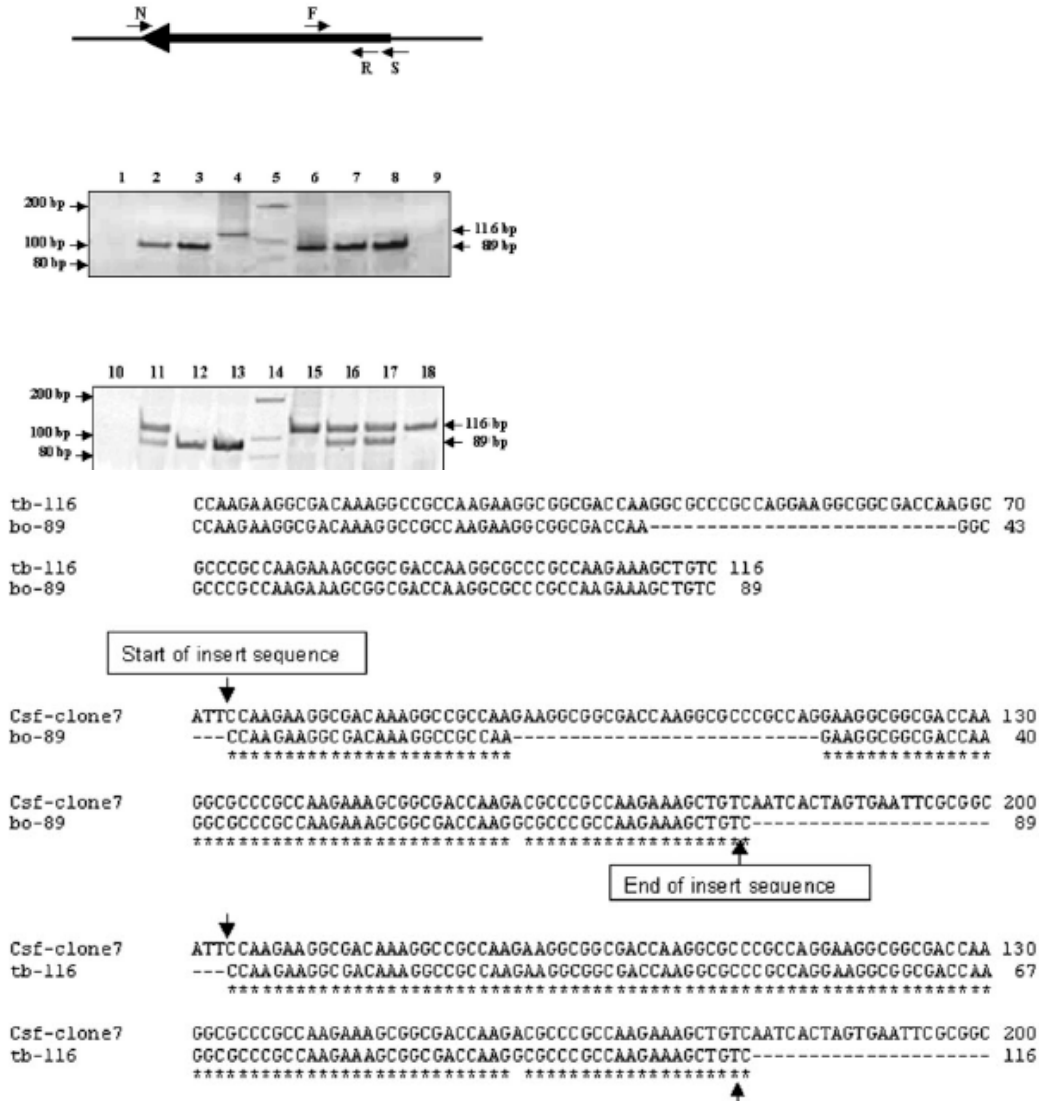
Sin embargo cada uno de estos blancos tiene limitaciones, por ejemplo el gen *mtp40* y la secuencia de inserción no están presentes en todas las muestras de *M. tuberculosis* y es importante identificar la especie dentro del complejo debido a las implicaciones zoonoticas del *M. bovis*, en ciudades en desarrollo y el potencial para detectar pacientes con infecciones mico bacterianas mixtas.

El gen *hupB* (Rv2986c) que codifica para una proteína parecida a histona, de *M. tuberculosis* fue utilizado por primera vez como un blanco para la detección y diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

En el análisis de este gen parecido a histona se ha mostrado que tiene una deleción de 27 pb que corresponde a 9 aminoácidos y en la amplificación de 618 pb obtenido del complejo *M. tuberculosis*, los productos correspondientes a la porción C terminal obtenidos mediante primers fueron de 318 pb para *M. tuberculosis* y de 291 pb en *M. bovis*.

Así el gen *HupB*, fue encontrado con 645pb [214 aminoácidos] para *M. tuberculosis* y de 618 pb [205 aminoácidos] en *M. bovis*. Este gen se ha utilizado como prueba diagnóstica para la detección e identificación de mico bacterias patogénicas (91,92), con buenos resultados y la utilidad de la prueba ha sido confirmada (93) Figura 5

Figura 5



Una de las limitaciones con la que se han enfrentado estudios previos es que para estudiar tejidos dañados en AT, la biopsia arterial implica un riesgo para el paciente; los tejidos en general, pueden ser obtenidos en un sentido ético en las etapas avanzadas del padecimiento y cuando existe una indicación quirúrgica o intervencionista de urgencia, según el órgano afectado.

Si nosotros analizamos todas estas las limitantes técnicas y que ha existido variabilidad en los abordajes de investigación para demostrar si existe relación o asociación de AT con infección, y donde los resultados actuales son pocos y algunos, - aunque descriptivos y claros-, poco convincentes y cuyos resultados varían. Tabla 1

Podemos justificar que la búsqueda de DNA mediante un estudio sistemático y con el apoyo de técnicas moleculares de vanguardia en los tejidos de aorta se podrá definir si existe asociación con infección por M tuberculosis, lo cual independientemente al resultado permitirán desarrollar o establecer nuevas hipótesis en la fisiopatogenia y permitirá saber si se tienen que plantear nuevas estrategias en el tratamiento.

2. Antecedentes

2.1 Históricos.

El Dr. Mikito Takayasu profesor en Oftalmología de la Universidad Kanazawa en Japón, reconoció por primera vez este padecimiento; él observó una característica peculiar y similar a una guirnalda, lo cual correspondía a una anastomosis arteriovenosa alrededor de la papila de la retina cuyo reporte fue escrito en 1908 (94,95). Figura 6



Figura 6

Caccamise y Whitman introdujeron el término de enfermedad de Takayasu en 1955 (5) y el nombre de "enfermedad sin pulso" fue dada por los Profesores Shimizu y Sano (96).

En México los primeros reportes son de 1957 (97).

2.2 Epidemiología.

La incidencia anual ha sido calculada en Minnesota, de 2.6 casos/millón/año (2) y en Suiza 1.2/millones/año podría estar subestimada (98); hay datos que sugieren que podría ser más común que otras vasculitis en México (4).

En hospitales con atención especializada se ha calculado una incidencia de 9 ingresos por cada 10,000 hospitalizaciones/ año, lo cual se atribuye a una mejoría en agudeza diagnóstica en los últimos años (7). Tabla 2

Tabla 2 Pacientes con Arteritis de Takayasu. Porcentaje de incidencia relacionado con la edad 1976-2003.

Año	10-19	20-29	30-39	40-49	AT cases	Hospitalización Anual	Porcentaje de incidencia/10,000/año
1976-1979	1	1	2		4	14499	2.7
1980-1984	2	6	3	1	12	11649	10.3
1985-1989	8	14	8	1	31	24537	12.6
1990-1994	9	12	1	4	26	23127	11.2
1995-1999	6	5	8	1	20	20940	9.5
2000-2003	4	5	6	2	17	24186	7
Total						118938	9/10,000/año

Soto ME, Espinola N, Flores-Suarez LF, Reyes PA. Takayasu's arteritis clinical features in 110 Mexican mestizo patients and cardiovascular impact on survival and prognosis. Clin Exp Rheumatol 2008;26 (3Suppl 49):S9-15

2.3 Etiopatogenia.

En relación a etiopatogenia han sido propuestas diversas teorías, como la posible participación de un mecanismo humoral, lo cual fue sugerido por la presencia de hipergamaglobulinemia en 75% de los casos activos y en el 30% de los inactivos (99), por hallazgos ocasionales de anticuerpos anti célula endotelial (100,101) y anticuerpos anti aorta (102,103), presencia de complejos inmunes (104), anticuerpos no-órgano específicos, como el factor reumatoide, anticuerpos antinucleares (105), anti citoplasma de neutrófilos (ANCA)(106), anticardiolipina y anti B₂ glicoproteína-1 y pruebas de VDRL falsas positivas, que han sido generalmente negativos (107), o también con relación con actividad de AT y anticuerpos anti-anexina V, pero estas observaciones no se confirmaron (108).

2.4 Inmunogenética

En relación a Inmunogenética, desde el descubrimiento de las moléculas del antígeno leucocitario de Histocompatibilidad (HLA), que sirven como elementos de restricción para el reconocimiento de muchos genes relacionados con procesos

patológicos; se consideró que este sistema podría estar relacionado con la susceptibilidad para desarrollar AT (109). Isoisha y colaboradores fueron los primeros en reportar una asociación positiva entre la presencia de HLA-B52 y AT en pacientes japoneses (110); la misma asociación se informó en coreanos (111), en árabes con HLA-A2-A9, BW35 y DR7 (112), en poblaciones americanas con el DR4/MB3 (DQW3) (113) y en hindús y mestizos mexicanos con HLA-B5 (114,115).

La estructura genética de la población mestiza mexicana posee 56% de genes Amerindios, 40% de genes Caucásicos y 4% de Negroides (116), la AT es una enfermedad relativamente común en esta población y estudios preliminares mostraron una asociación con el HLA-DR6 (posiblemente DRB1*1301), así como incremento en la frecuencia de HLA-B39 (117).

La posibilidad de la influencia de alelos HLA sobre la susceptibilidad a desarrollar AT, se sustentó a través de estudios en diferentes poblaciones, que incluye el análisis de familias de casos múltiples.

En 1978, Numano reportó un caso de AT en gemelas monocigóticas (118); más tarde propuso que los factores hereditarios podrían tener un papel en la patofisiología de esta enfermedad (119) y hay un caso descrito de dos hermanas que desarrollaron la enfermedad a pesar de haber crecido en ambientes diferentes (120).

Se desconoce si la susceptibilidad o resistencia a la progresión de AT es un rasgo poli génico. En tuberculosis por ejemplo, se ha informado que existen al menos tres regiones en el genoma humano determinantes en la susceptibilidad a enfermedad donde están involucradas regiones de clase I y II del MHC (121).

En un estudio reciente en AT se reportaron alelos específicos de moléculas clase I asociadas a enfermedad, de los cuales se relacionaron con AT: HLA-B39, HLA-B44 y HLA-B52, con pacientes con tuberculosis pulmonar HLA-B35 y con extra pulmonar HLA-B39 y HLA B40 y con un grupo control sano de población abierta, con y sin exposición a pacientes con tuberculosis y sin desarrollo de enfermedad con HLA B14 (122).

Signos y síntomas en AT

La enfermedad tiene manifestaciones clínicas muy diversas; se le ha considerado la gran imitadora (123) y tiene dos fases: una temprana, en la que existe un proceso inflamatorio y pueden presentarse síntomas generales como fiebre, malestar general, astenia adinamia, cefalea, tos y una crónica, que es caracteriza por fibrosis y oclusión

vascular (3) donde los síntomas son complejos y pueden presentar síncope, mareo, disnea, claudicación de extremidades, enfermedad vascular cerebral, hipertensión arterial angina e infarto agudo del miocardio o bien una combinación de ellos (124).

2.5 Criterios de Clasificación

Tabla 3

CRITERIO	DEFINICION
Edad de comienzo de la enfermedad en años	Desarrollo de síntomas o hallazgos relacionados con la arteritis de Takayasu <40 años de edad.
Claudicación de las extremidades	Desarrollo y empeoramiento de la fatiga y el dolor en músculos de una o más extremidades mientras están en actividad, especialmente las extremidades superiores.
Pulso de la arteria braquial disminuido	Disminución del pulso de una o ambas arterias braquiales
Diferencia de presión arterial >10mmhg	Diferencia de >10mmhg en la presión arterial sistólica entre brazos
Soplo sobre las arterias subclavias o aorta	Soplo audible en la auscultación sobre una o ambas arterias subclavias o aorta abdominal
Arteriograma anormal	Estrechez de una o varias arterias u oclusión completa de la aorta, ramas primarias, o arterias grandes proximales en extremidades superiores o inferiores, no atribuidas a arteriosclerosis, displasia fibromuscular, o causas

Si el paciente tiene arteritis de Takayasu: al menos 3 de los 6 criterios están presentes. La presencia de 3 o más criterios presentan una sensibilidad del 90.5% y una especificidad del 97.8%.

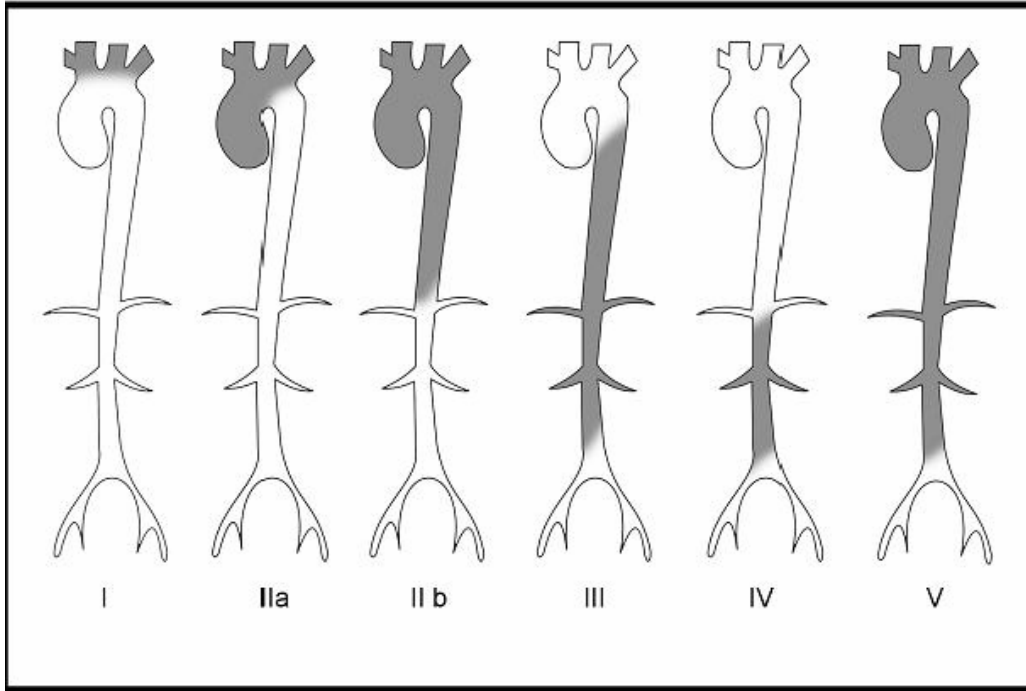
Clasificación de la arteritis de Tocayas por el American Collage of Rheumatology (ACR)(125). (No se consideró en los niños la clasificación EULAR/PRINTO/PRES. Con nuevos criterios de clasificación. ANKARA 2008. Ann Rheum Dis 2010 69:798-806

2.6 Clasificación del daño arterial

La clasificación por angiografía y utilizada en consenso es la de Hata¹⁵, comprende:

- **Tipo I:** Comprende lesiones en las ramas del arco aórtico.
- **Tipo Ila:** Involucra la aorta ascendente, el arco aórtico y sus ramas.
- **Tipo I Ib:** Las lesiones de tipo Ila además de la aorta descendente.
- **Tipo III:** Las lesiones se localizan en aorta descendente, abdominal y/o renal.
- **Tipo IV:** Únicamente vemos lesiones en la aorta abdominal y/o arterias renales.
- **Tipo V:** Las Lesiones son extensas: aorta en su totalidad así como sus ramas
- (Se suma C o P si hay lesión coronaria o pulmonar) (ver Figura 6)

Figura 6



El diagnóstico diferencial incluye padecimientos asociados a daño vascular, que incluyen Lupus eritematoso sistémico, aortitis sifilítica, aneurismas micóticos, aortitis secundaria a fiebre reumática, enfermedad de Behcet, Crohn, espondilitis anquilosante, arteritis temporal, neurofibromatosis, coartación congénita, ergotismo enfermedad de Buerger y fibrosis por radiación.

2.7 Métodos Diagnósticos.

La pna ortografía es el método establecido como estándar de oro, para el diagnóstico de AT (127); se utiliza en ausencia del estudio histopatológico aunque en la actualidad nuevos métodos de vanguardia en imagen podrían desplazarla (128). Las características de la lesión arterial detectadas por este método son: estenosis y oclusión que se observan de forma segmentaria (129) y en raras ocasiones, hay aneurismas posteriores a la estenosis (130,131). Con frecuencia se establece una circulación colateral a la arteria ocluida que es capaz de reducir, con el tiempo, los efectos de la irrigación deficitaria regional (132). Para evaluar actividad inflamatoria arterial en AT no hay un consenso; existen criterios clínicos y de laboratorio que aunque se utilizan, no son

específicos para definir actividad (133), reportes actuales con estudios por tomografía por emisión de positrones (PET FDG¹⁸) para definir actividad, prometen una evaluación de mayor certeza (134). Figuras 7 y 8

Figura 7

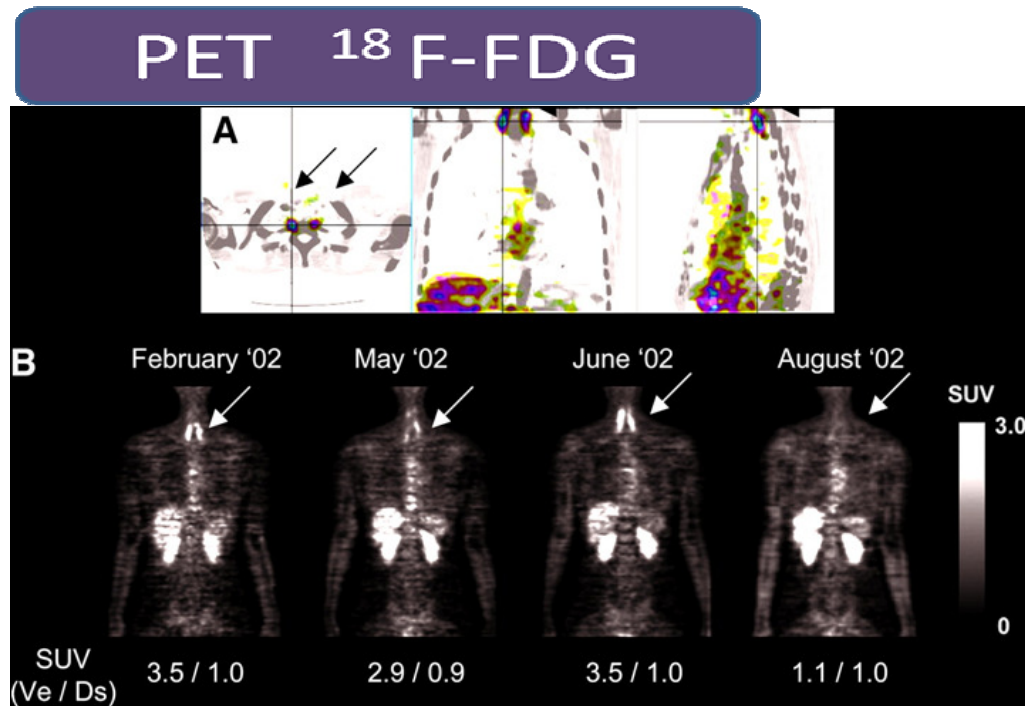
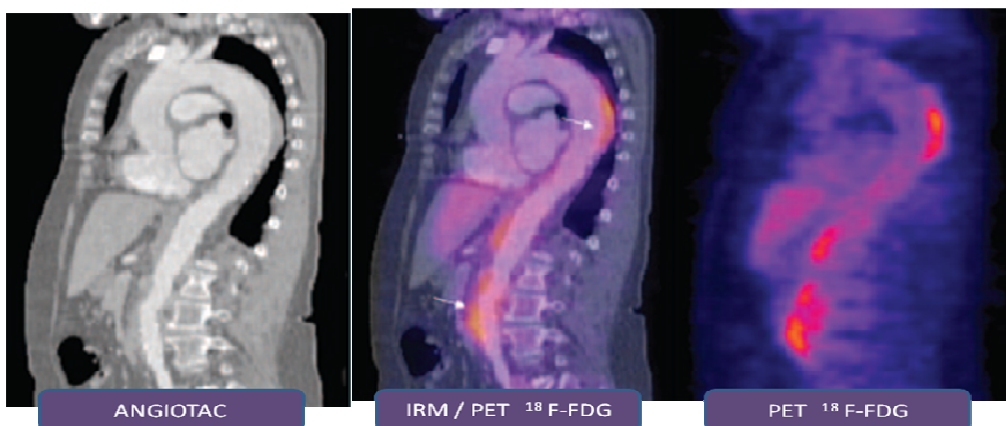


Figura 8

ARTERITIS DE TAKAYASU



2.8 Tratamiento.

El curso de la enfermedad es variable, la terapia tiene limitaciones, hasta un 93% de pacientes alcanzan la remisión, pero solo el 28% la sostienen con terapia convencional con glucocorticoides e inmunosupresores (135). Generalmente aumenta la morbilidad en los pacientes no tratados, lo cual ocurre por retraso en el diagnóstico, lo que además conlleva con el tiempo a obstrucción de la arteria principal que irriga un órgano (136).
Figuras 9 10 Y 11

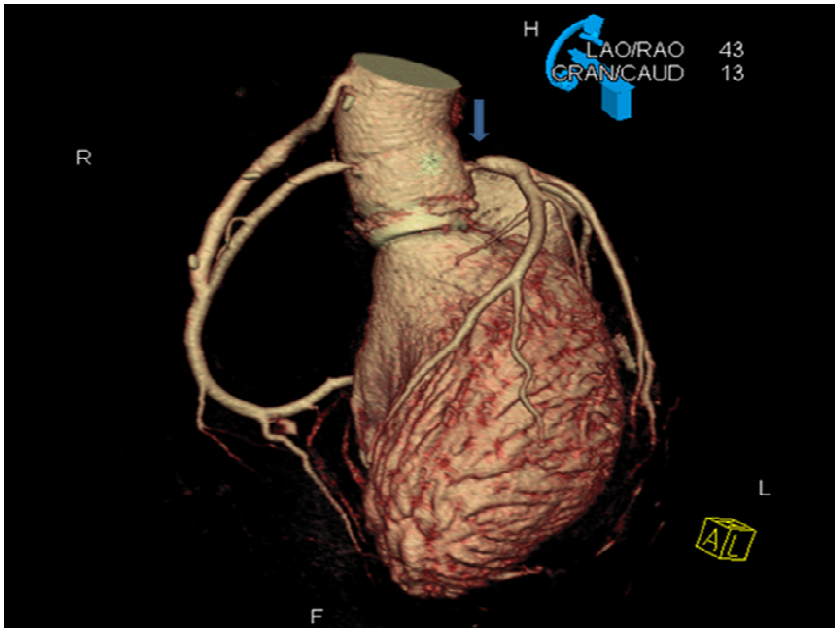
Figura 9



Figura 10



Figura 11



Entre las complicaciones subsecuentes de estenosis/oclusión del daño arterial son: glomerulopatía (137), falla renal terminal (138-140), hipertensión arterial y accidentes cerebro vasculares (141-144), alteraciones en la agudeza visual, cataratas y ceguera (145-149), hipertensión pulmonar (150,151), falla cardiaca congestiva (152), infarto agudo del miocardio (153-157), valvulopatía aortica, cuyas complicaciones tienen desenlace en muerte en edades tempranas (7).

La terapia principal es con esteroides orales; aunque no hay estudios controlados, se ha encontrado que resuelven los síntomas, reaparece la pulsación arterial y el retardo en progresión de la enfermedad vascular (1,2, 124,158-160).

En aquellos que no responden a esteroides se ha utilizado la terapia cito tóxica con metotrexato, azatioprina o ciclofosfamida (161,162), mofetil micofenolato (163), e infliximab y otros biológicos (164,165).

En pacientes con oclusión vascular irreversible, la angioplastia transluminal (166-168) y el uso de "stent" han mostrado ser útiles (169-171), sin embargo, puede haber aneurismas con falsa anastomosis y oclusión postangioplastía/Stent de los vasos involucrados (172,173), o bien complicación en los procedimientos para lo cual hay recomendaciones quirúrgicas específicas en la reconstrucción arterial con riesgos altos (174) y en la preservación de órgano con los riesgos inherentes. (175).

3. Planteamiento del problema

La morbilidad y mortalidad en AT está relacionada a estenosis y/o oclusión arterial, resultado de inflamación crónica, la cual conlleva a fibrosis. La etiología aun es desconocida, se ha informado desde hace más de 5 décadas de una posible relación con infección por *M. tuberculosis* pero ha habido diversidad en la metodología y las técnicas de apoyo del laboratorio utilizadas para la búsqueda de esa asociación, por lo que los resultados son controversiales. Los estudios en el tejido afectado son pocos, por la dificultad para obtener tejido arterial, lo cual solo es posible en la fase avanzada del padecimiento, donde se requiere de cirugía o del uso de stent endovascular, ambos procedimientos de riesgo y costo elevado. El uso de esteroides e inmunosupresores tiene limitantes y la terapia antituberculosa no está justificada. Se requiere mejorar las estrategias de investigación.

4. Pregunta de investigación

¿La búsqueda e identificación de secuencias de genes asociados a especies de *Micobacterium* permitirán establecer o rechazar una asociación con el daño arterial en pacientes con arteritis de Takayasu?

¿El daño arterial en arteritis de Takayasu es una manifestación de tuberculosis extra pulmonar?

5. Justificación

La AT ocurre principalmente en la infancia y las complicaciones relevantes en diversos órganos son observadas en la edad más productiva.

La posible participación de *M. tuberculosis* en esta vasculitis no ha sido ampliamente explorada.

En teoría, AT podría tratarse de una forma de tuberculosis extra pulmonar, que al igual que la identificación *M. tuberculosis* en otros órganos y su posible participación, sería difícil de demostrar.

El identificar su presencia en los tejidos dañados mediante la búsqueda de las secuencias de inserción que han sido empleadas para el estudio taxonómico de *M. tuberculosis* y para definir especie, nos dará información importante para plantear la posibilidad de nuevos estudios enfocados a su fisiopatogenia y tratamiento.

Si se demuestra su presencia mediante estas secuencias en la aorta, los estudios deberán ser orientados al efecto funcional de su presencia, o bien a explorar si *M. tuberculosis* mantiene un estado latente al igual que en otros tejidos, en donde quizás la depuración del bacilo por el sistema inmune, se ve afectada por las diversas estrategias de evasión que utiliza ante el sistema bactericida del macrófago.

Este estudio con un enfoque metodológico diferente a los previos y con un enfoque más cercano para eliminar el azar, podría proporcionar un avance en el estudio de este padecimiento.

6. Factibilidad

Los métodos de conservación de los tejidos fueron adecuados. El proyecto fue aceptado por CONACYT Numero 53248/66782.

7. Objetivo general

Identificar la presencia de *secuencias IS6110 y del gen HupB*, asociados, a *M. tuberculosis* en aortas de arteritis de Takayasu.

8. Objetivos específicos

Identificar y cuantificar la presencia de las secuencias conocidas del gen *HupB* del complejo *M. tuberculosis* para diferenciar *M tuberculosis* y *bovis*. En los casos con AT y comparar con el grupo con tuberculosis y el de aterosclerosis.

Identificar las secuencias de fragmentos de repetición del gen IS6110 que determinan al complejo M. tuberculosis.

9. Objetivos secundarios

- a. Analizar el infiltrado celular de la pared arterial y la fibrosis.
- b. Determinar la presencia o no de actividad inflamatoria arterial en la aorta y

correlacionar con la actividad clínica.

- c. Correlacionar la actividad y presencia de secuencia de los genes buscados.
- d. Correlacionar, de acuerdo a la clasificación de daño arterial (Numano), con presencia o no de secuencias.
- e. Correlacionar el tipo de fallecimiento y tiempo de evolución del padecimiento.
- f. Correlacionar el tiempo de evolución del padecimiento y presencia o no de secuencias.

10. Hipótesis

10.1 Nula.

En tejidos de aorta de pacientes con arteritis de Takayasu, el porcentaje y presencia de secuencias de *inserción IS6110* y *secuencias del gen HupB*, asociados al complejo *Micobacterium tuberculosis* es similar a los controles sin tuberculosis conocida y están ausentes o su frecuencia es baja, cuando se compara con los casos con tuberculosis comprobada.

10.2 Alterna.

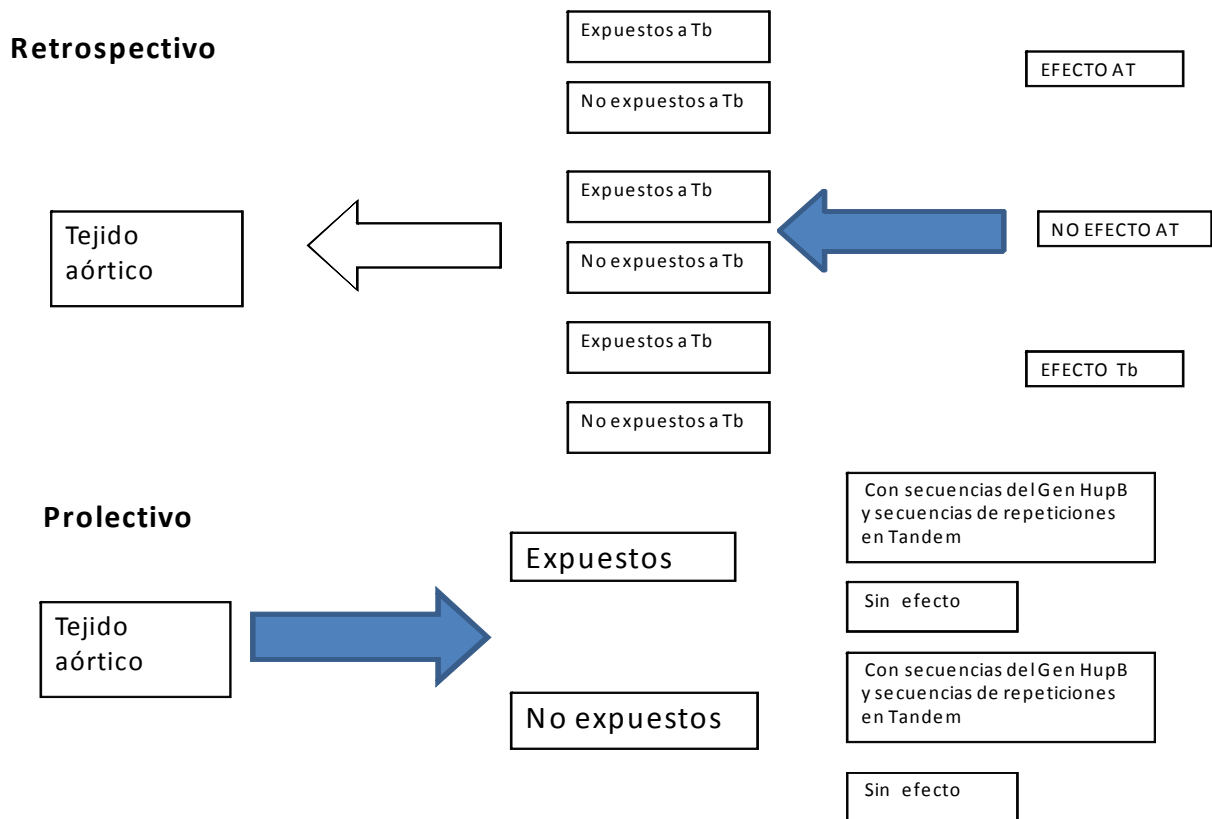
En tejidos de aorta de pacientes con arteritis de Takayasu, el porcentaje y presencia de secuencias de inserción IS6110 y secuencias del gen HupB asociados al complejo *Micobacterium tuberculosis* están incrementados, cuando se compara con los controles sin enfermedad tuberculosa conocida y es similar a los casos con tuberculosis comprobada.

11 Metodología

11.1 Tipo de estudio:

Descriptivo observacional, retrospectivo (1ª fase) para la selección de casos y controles; prolectivo (2ª fase), para el estudio genómico en tejidos.

11.2 Diseño (Casos y controles) **11.3 Tipo de muestreo:** Muestreo no probabilístico de casos consecutivos.



11.4 Selección de Casos y controles.

En el archivo del Departamento de Patología, se revisaron los libros de reportes de 50760 autopsias, estudio anatómo-histopatológico, en donde se buscaron los casos registrados con arteritis de Takayasu y con otros nombres en el diagnóstico utilizados por los médicos, tales como (enfermedad sin pulsos persistente, tromboangitis obliterante, enfermedad sin pulso, arteritis inespecífica, Síndrome de Martorell, tromboangitis obliterante subclavio aórtica y síndrome del arco aórtico) para los controles un grupo de casos con tuberculosis pulmonar, extra pulmonar y con aterosclerosis, se identificó si en la descripción del Patólogo que realizó la autopsia obtuvo segmentos de aorta cuando y cuál fue el motivo para conservar ese tejido.

Una vez que se localizaron los casos y controles en el expediente de Patología, se procedió a localizar los bloques de tejidos, en el almacén de tejidos, y estos fueron llevados a los dos Patólogos en forma cegada para verificar que los bloques correspondían a tejidos de aorta y se evaluarán las condiciones de conservación.

En el archivo de expedientes clínicos, se buscó el expediente clínico de cada uno de los casos definidos por el expediente de Patología con diagnóstico de arteritis de Takayasu o con alguna de sus variedades nominales, para analizar también en el expediente clínico, que el caso cumpliera con criterios clínicos para AT y que también hubiesen sido descritos en el expediente clínico durante su condición en vida, se confrontó el expediente clínico y el expediente de patología para seleccionar casos sin duda diagnóstica; se buscó el resultado del estudio de pana ortografía de acuerdo a lo descrito en los registros de hemodinamia con el objeto de conocer el tipo clasificación que le fue asignado en cuanto a la localización del daño arterial de acuerdo a la Clasificación de Hata et al.

En los controles con tuberculosis se seleccionaron los casos con diagnóstico confirmado en el expediente de Patología y que en el expediente clínico se hubieran confirmado mediante biopsia o cultivo según el caso y por los hallazgos específicos de tuberculosis en la autopsia.

Una vez seleccionado cada fenotipo, se incluyeron aquellos casos y controles donde la historia clínica cumpliera con los datos que se requerían para los criterios de inclusión.

De todos los grupos se obtuvieron datos del tipo de sintomatología y hallazgo del daño cardiovascular por el cual llegaron al Instituto.

En los controles con aterosclerosis el diagnóstico estaba reportado por el Patólogo con los registros adecuados para considerar aterosclerosis y se correlacionaron también con los datos clínicos, historia y estudios que fueron solicitados durante su estancia hospitalaria hallazgos cardiovasculares y tiempo de evolución con el diagnóstico; la correlación fue similar buscando datos en el expediente clínico y el reporte del patólogo en relación a la selección de estos controles y se buscó historia de comorbilidad.

11.5 Casos identificados.

Una vez identificados casos y controles:

1.- Se buscaron en el archivo de anfiteatro las piezas de aorta en cada grupo, embebidas en parafina (bloques).

2.- Se revisaron los tejidos y se corrió (grupo piloto) de 10 tejidos por grupo para definir calentamiento de desparafinación y para la búsqueda de la recuperación del

antígeno óptima con una batería a diferentes modos de fusión y evaluar también calidad y pureza en la extracción del DNA.

3.-Cada caso se mantuvo con un código el cual permitió que el estudio mantuviera cegado cada grupo de cada tejido, para el Biólogo Molecular, Químico y Patólogo.

4.- Se realizó la búsqueda de género de *Mycobacterium tuberculosis* y *bovis* mediante los flanqueamientos de secuencias de restricción mediante la técnica de RFLP del gen HupB.

11.6 Criterios de Inclusión

1. Expediente completo de Patología y clínico.
2. Fenotipo de casos y controles clasificado de acuerdo a los criterios de clasificación según el caso o control.
3. Bloques de muestra de tejido (aortas) que hubieran sido procesados con la misma técnica y que se encontraban en buen estado para cada grupo de pacientes.
4. Se buscó que el material extraído para DNA fuera suficiente

11.7 Criterios de Exclusión.

1. Expedientes de Patología o Clínicos incompletos para identificar variables.
2. Casos o controles con duda diagnóstica.
3. Material probablemente contaminado por el modo de conservación.
4. Casos de Aterosclerosis casos con comorbilidad múltiple.

11.8 Criterios de eliminación

Las muestras ya consideradas de elección si no se obtuviera suficiente material para el procesamiento y extracción de DNA o pureza inadecuada

11.9 Tamaño de muestra

Se desconoce incidencia de tuberculosis en AT; se realizaron análisis con diversos escenarios; este cálculo se realiza en la posibilidad de que la expresión de tuberculosis extrapulmonar muestra diversidad en prevalencias (7-35%) de acuerdo a sitio afectado. y de una prevalencia de 5% en población general.

11.10 Cálculo de tamaño de muestra

Para cálculo de proporciones en muestras independientes (casos y controles)

$$pq_0q_1 \left[\frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta} \sqrt{\frac{p_1q_1}{pq_0q_1}}}{(p_1 - p_0)^2} \right]^2$$

Sujetos= 31 por grupo.

Poder estadístico 90% $p > 0.05$.

Se calcula a partir de una incidencia de tuberculosis latente aproximada de Tb extra pulmonar (0.25) y en los tuberculosos de (.05) $\Delta = (0.20)$

$$(.25)(.75) \left[\frac{1.96 + 1.28 \sqrt{\frac{p(.05)(.95)}{(.25)(.75)}}}{((.25) - (.05))^2} \right]^2$$

11.11 Poder de la muestra.

$$\left[\frac{\sqrt{pq_0q_1}}{p_1q_1(Z_{\alpha/2})} + \frac{\|p_0 - p_1\sqrt{n}\|}{\sqrt{pq_0q_1}} \right] \alpha = 0.05 \quad p_0 = 0.25 \quad p_1 = 0.05 \quad n = 33 = 0.964$$

12. Definición de las variables de estudio

12.1 Variables Independientes

CASOS			
Takayasu tipo 1	Lesiones en ramas del arco aórtico	dicotómica	0. no 1. si
Takayasu Tipo IIa	Involucra aorta ascendente, arco aórtico y sus ramas	dicotómica	0. no 1. si
Takayasu Tipo IIb	Lesión similar a IIa + aorta ascendente.	dicotómica	0. no 1. si
Takayasu Tipo III	Lesiones en aorta descendente, abdominal y/o arterias renales	dicotómica	0. no 1. si
Takayasu Tipo IV	Lesiones únicamente en aorta abdominal y/o arterias renales	dicotómica	0. no 1. si
Takayasu tipo V	Lesiones extensas aorta en su totalidad	dicotómica	0. no 1. si
Involucro coronario	Involucro de arteria coronaria	dicotómica	0. no 1. si
Involucro pulmonar	Involucro de arteria pulmonar	dicotómica	0. no 1. si
Actividad del padecimiento	Declarado por el médico tratante antes del fallecimiento	dicotómica	0. no 1. si
CONTROLES CON TUBERCULOSIS			
Cultivo diagnostico	Reportado en el expediente	dicotómica	0. negativo 1. positivo
Biopsia diagnóstica	Reportado en el expediente	dicotómica	0. negativo 1. positivo

12.2 Variables dependientes

Presencia de secuencias específicas de IS6110	Detección de repeticiones en tándem del gen IS6110 y definido por PM De 123pb	Dicotómica	0. no 1. si
Presencia de secuencias específicas de <i>M bovis</i>	Diferencia de 27pb en la región C Terminal de el gen hupB en <i>M bovis</i> (<i>Mb3010c</i>)	Dicotómica	0. no 1. si
Presencia de secuencias específicas de <i>M. tuberculosis</i>	Diferencia de 27pb en la región C Terminal de el gen hupB en <i>M tuberculosis</i> (<i>Rv2986c</i>) y <i>M bovis</i> (<i>Mb3010c</i>)	Dicotómica	0. no 1. si
Infiltrado inflamatorio	Presencia de infiltrado inflamatorio	Dicotómica	0. no 1. si
Fibrosis	Presencia de fibrosis	Dicotómica	0. no 1. si
Ateroma	Presencia de ateroma	Dicotómica	0. no 1. si
Granuloma	Lesión granulomatosa	Dicotómica	0. no 1. si
Ateroma	Lesión ateromatosa	Dicotómica	0. no 1. si
Lugar de localización de la capa arterial	Lesión en la adventicia, media o intima	Nominal	0.intima 1.media 2. adventicia

12.3 Variables de asociación con posible confusión y modificación de efecto

- a. Lugar de Nacimiento: Considerando la epidemiología de cada lugar en relación a tuberculosis, fue evaluada como variable nominal y después se buscó si el lugar correspondía a zona endémica y se evaluó como variable dicotómica.
- b. Nivel socioeconómico: Generalmente asociado con una clasificación interna en relación los recursos con que cada paciente cuenta, los cuales clasificaremos de manera ordinal: 1.-Bajo, 2 Medio, 3 Alto.

12.4 Otras variables: Tabaquismo y causa de la defunción

13. Aspectos éticos

El Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología aprobó el estudio de acuerdo a los criterios Helsinki versión 2000. De acuerdo a los lineamientos y a la investigación en humanos Título Segundo, artículo 14 que comprende apartado III, VI es realizado por profesionales en Salud, que se refiere el artículo 114, apartado VII. Comprende el artículo 17 apartado II, es una investigación con riesgo mínimo. (Hoja anexa)

14. Universo

Universo de estudio de casos (AT) confirmados de acuerdo a los criterios de ACR y controles (tuberculosos y aterosclerosis), obtenidos del departamento de patología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

15. Control de procedimientos (Anexo 1)

Todos los testigos se realizaron como se recomienda en las guías para métodos diagnósticos moleculares, con trabajo de flujo unidireccional y separación física de preparación de reagentes y procedimientos de detección de producto. Controles incluidos en formol parafina fueron procesados de la misma forma que la muestra prueba.

1. Una vez seleccionado el tejido adecuado se inició con el proceso de desparafinización.
2. Extracción del DNA de tejidos fijados en
3. Procesamiento del tejido por PCR
4. Amplificación del DNA

15.1 Muestra de Micobacteria. *M tuberculosis H37Rv*, fue obtenida de materia Líneas celulares extraídas de las cepas de *M Bovis AN5* y de *M tuberculosis HRv37*. Proporcionada por el departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología.

15.2 Obtención del tejido.

Técnicas en el anexo I. Para cada bloque de tejido embebido en parafina se hicieron cortes con un micrótopo. Para prevenir una posible contaminación con la hoja del

micrótopo, se realizó una asepsia con octano y alcohol al 100% antes y después de cortar cada muestra. La parafina de cada corte de tejido fue extraída usando octano y alcohol al 10%. Procesamiento de los tejidos embebidos en parafina (Kit Illustra Nucleon BACC Genomic).

15.3 Extracción del DNA de tejidos embebidos en parafina

El DNA se obtuvo utilizando un kit comercial (Illustra Nucleon Genomic, GE Healthcare) según las indicaciones del fabricante. Brevemente 20-30 micras de tejido en parafina contenidos en un tubo de 1.5 ml se cubrió con xileno para desparafinar el tejido que se incubó 2 minutos. Se centrifugó y se removió el xileno. El tejido se re hidrató por lavados con etanol al 100%, al 75%, al 50% y por último al 25%.

Después de estos lavados se agregó proteinasa K y se incubó toda la noche. Después del periodo de incubación se desproteinizó con perclorato de sodio. Se realizó la extracción con la resina Nucleon. Se precipitó el DNA con etanol absoluto, posteriormente se lavó el DNA con etanol al 70% y se cuantificó.

La cuantificación se realizó y se obtuvo la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260/280 nm. El espectrofotómetro nos indicó la concentración del DNA (260nm), la pureza (260/280nm) de la cual decidimos que para el estudio tuviera valores de 1.7 a 1.8, el espectrómetro nos indicó concentración de la muestra de DNA la cual ya obtenida, se ajustó a una concentración final de 200 ng/ μ L para su posterior utilización. Se almacenaron las muestras a -70 °C.

15.4 Amplificación del DNA

Protocolo de PCR: Amplificación de *Mycobacterium tuberculosis IS6110 gene*. AMPLIFICACIÓN DE DNA DE 123pb del elemento de inserción (IS6110). Se utilizaron los oligonucleótidos IS6110 f (5' CCTGCG AGC GTA GGC GTC GG-3') y IS6110 r (CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3') .

Protocolo de PCR Amplificación de *Mycobacterium bovis y tuberculosis hupB gene* PCR anidada. El blanco de la prueba es la diferencia de 27pb en la región C Terminal del gen hupB en *M. tuberculosis (Rv2986c)* y *M. Bovis (Mb3010c)*. Los iniciadores o primers usados para amplificar el gen hupB: Primers N (5'GGAGGGTTGGGATGAACAAAGCAG-3') y S (5'GTATCCGTGTGTCTTGACCTATTTG3').

La prueba anidada para la región C terminal del gen hupB primers: F

(5'CCAAGAAGGCGA CAAAGG3') y R (5'-GACAGCTTTCTTGGCGGG-3').

15.5 Protocolo de PCR: Amplificación del gen de *M. tuberculosis* IS6110

Para la amplificación del DNA de 123pb del elemento de inserción (IS6110), se utilizaron los oligonucleótidos IS6110 f (5' CCTGCG AGC GTA GGC GTC GG-3') y IS6110 r (CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3') brevemente, para una reacción de 25 µl, agregamos 10.7µl de H₂O doblemente destilada, 2.5µl de buffer 10x, 1.5µl de MgCl a 25 mM, 300 µM cada uno de los 4 trifosfatos desoxirribonucleótidos (disponibles en el kit del reactivo gen Amp PCR proporcionado por Applied Biosystem of Roche Company, USA), 0.125 µl de Taq polimerasa (Perkin Elmer), primer hacia delante (forward) y en reversa (reverse) a concentración final de 10pmol y 5 µL de muestra de DNA. El siguiente ciclo de amplificación fue usado para la PCR. Tres minutos a 95°C, 30 ciclos cada uno a: 94°C-30 segundos (desnaturalización), 63°C-30 segundos (alineación) y 72°C por un minuto (extensión), finalmente un ciclo de 72°C por diez minutos.

15.6 Protocolo de PCR Amplificación de *Mycobacterium bovis* y *tuberculosis* *hupB* gene PCR anidada.

El blanco de la prueba es la diferencia de 27pb en la región C Terminal del *gen hupB* en *M. tuberculosis* (Rv2986c) y *M. Bovis* (Mb3010c). Los iniciadores o primer usados para amplificar el *gen hupB*: Primers N (5'-GGAGGGTTGGGATGAACAAAGCAG-3') y S (5'GTATCCGTGTGTCTTGACCTATTTG-3').

La prueba anidada para la región C terminal del *gen hupB* primers: F (5'CCAAGAAGGCGA CAAAGG3') y R (5'-GACAGCTTTCTTGGCGGG-3'). Cuatro µl del producto amplificado de PCR con iniciadores (primers) N y S fueron usados como un templado de DNA para la PCR anidada. Cada reacción mixta (40µl) de la PCR anidada contuvo 1.25mM MgCl₂, 200µM de trifosfato deoxinucleotido, 0.5µM primers F y R, 10mM Tris-HCL (pH 8.8), 50mM KCL, 0.08% Nonidetp-40 y 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa. La mezcla de la reacción estuvo sujeta a desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos y 35 ciclos cada uno de 1min. a 94° C y alineación y extensión a 59°C y 72°C por 1 min., seguido de una extensión a 72°C por 10 minutos. Los productos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% y teñidos con bromuro de etidio y/o nitrato de plata. Los tamaños esperados para *M. tuberculosis* y *M. bovis* fueron de 116 y 89 pb, respectivamente. El

límite de detección fue de 50 fg, el cual es equivalente a 5 bacilos tuberculosos. Un doble control fue incluido para discernir entre infección mixta de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

15.7 Daño Histológico.

Se utilizaron tinciones del tejido con hematoxilina –eosina, Auramina y Ziehl Nielsen Y Masson. Fue evaluado por una especialista certificada en Patología experta en morfometría, quien evaluó la presencia de fibrosis y de infiltrado inflamatorio. Se realizó correlación del reporte inicial en la autopsia con la evaluación del Patólogo experto cuya correlación fue de 0.99. Se consignaron los hallazgos macroscópicos anexos tanto en caso como controles, para evaluar el análisis final y la discusión.

16. Análisis estadístico

Fase descriptiva: Permitió conocer las características sobresalientes en este estudio en cuanto a la distribución de cada una de las variables, dependientes e independientes. En variables de distribución normal, se informó con media y desviación estándar. En variables sin distribución Gaussiana se utilizaron medidas de frecuencia absoluta y relativa por proporciones y razones. Se realizó un análisis bivariado de las variables de importancia y análisis de inferencia estadística según el caso, con χ^2 o prueba exacta de Fisher. Como medidas de asociación se reportaron razón de momios. Se evaluaron todas las variables para decidir si se podía realizar un estudio de análisis de escalamiento óptimo, HOMALS, que es la homogeneidad mediante mínimos cuadrados alternantes. El análisis Clúster no inferencial, factorial o de correlación canónica, este último fue considerado, haciendo posible buscar una asociación multivariada con este último método después de aplicar estadísticos comparativos convencionales siempre que lo permitiera la relevancia práctica de los grupos creados. Software SPSS versión 16 y Stata10.

Para el análisis multivariado se utilizó la correlación canónica (CC), la cual permite el análisis de dos grupos de variables, las de respuesta o efecto; en este caso, son tipo de tuberculosis, presencia de genes asociados a micobacterias *gen IS6110* y *HupB*, lesión aórtica, edad al momento del diagnóstico y presencia de granuloma que en este caso eran: $U(p) (X_1, X_2, \dots, X_p)$, y el otro grupo corresponde a aquellas variables que explican o que son predictoras como nivel socioeconómico, índice de masa corporal, exposición a

tuberculosis y tiempo de evolución $V(q)$ ($Y_1, Y_2 \dots Y_q$), al igual que en los modelos de regresión múltiple, con la diferencia de que la correlación canónica puede tener más de dos variables en ambos lados de la ecuación, el principal objetivo de la CC es identificar las combinaciones lineales al interior de las variable respuesta:

$$U_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1p}X_p$$

$$U_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2p}X_p$$

$$U_r = a_{r1}X_1 + a_{r2}X_2 + \dots + a_{rp}X_p$$

Y con la variable predictora:

$$V_1 = b_{11}Y_1 + b_{12}Y_2 + \dots + b_{1p}Y_p$$

$$V_2 = b_{21}Y_1 + b_{22}Y_2 + \dots + b_{2p}Y_p$$

$$V_r = b_{r1}Y_1 + b_{r2}Y_2 + \dots + b_{rp}Y_p$$

La correlación más grande fue identificada entre U_1 y V_1 , la segunda más grande entre U_2 y V_2 , con la condición de que no exista una correlación entre U_1 y U_2 , ni entre V_1 y V_2 ; y la tercera correlación más grande estará dada entre U_3 y V_3 , y como se mencionó anteriormente, no debe haber correlación entre U_3 y U_1 y U_2 , ni entre V_3 y V_1 y V_2 . A estas combinaciones se les conoce como variables canónicas.

17. Cronograma de actividades

Este estudio requirió primero de presentar el proyecto al Comité de Ética, para lo cual requirió de un tiempo aproximado de 3 meses. Una vez aprobado el proyecto se inició con la revisión de los tomos y expedientes del archivo de patología, se seleccionaron los casos y controles que podrían considerarse en el estudio, a la vez que se revisó el Archivo de bloques de tejidos para evaluar que existieran como se consignaba en los tomos. Consideré mi inscripción a la UNAM para la selección al programa de Doctorado. En forma alterna envié a CONACYT el proyecto para concursar y obtener fondos los cuales fueron aprobados y proporcionados. Una parte menor fue

proporcionada por los fondos del Instituto a los departamentos de Patología e Investigación.

Debido a que cada tomo contiene al menos más de 100 registros de autopsia y existen un total de 1000 tomos se inició con la búsqueda un año antes de solicitar la selección para aspirante y se continuó con la búsqueda una vez que se logró la aceptación. Así, también se seleccionaron artículos para el proyecto y formar la selección de artículos.

Una vez que se obtuvo esto, consideré presentar a mis tutores el resultado; una vez aceptada en el Programa, inicié con la obtención de datos completos de los archivos: de patología, clínicos y de un departamento de Microfilmados.

Se muestra lo que ha seguido desde el inicio de mi aceptación al Programa.

Año	Mes	Actividad
2009	Marzo-Julio	Terminar Búsqueda de expedientes en archivos clínicos y correlación de datos, con los de patología. Localización y selección de bloques de tejidos de aorta, revisión del estado de los tejidos. Elaboración y revisión del escrito.
2009	Agosto Septiembre	Revisión del escrito. Evaluando consideraciones sugeridas en presentación anterior. Búsqueda del control positivo de Tuberculosis, cortes de los bloques, para obtener alícuotas que serían enviadas al departamento de Biología Molecular y Fisiología (con código cegado). Estudio preliminar de los tejidos. Después del verificado, se inició con el estudio formal en todos los tejidos. Cortes y teñido para laminillas. Inicio de valoración de laminillas por patología.
2009	Octubre	Estandarización de pruebas de calentamiento para desparafinización. Evaluación con un grupo piloto para determinar, calidad y pureza del DNA
2009	Noviembre	Amplificación, DNA y determinación y obtención de resultados de estudio de secuencias de los genes estudiados.
2009	Diciembre	Se continuó con revisión de laminillas Apertura del código y análisis de resultados.
2010	Enero	Sesión conjunta con tutores
2010	Febrero	Presentación en la sesión de investigación de INCMSZ

2010	Marzo- Mayo	Preparar publicación
2010	Junio	Envío a publicación.
2010	Junio	Fecha de posible examen de candidatura.

18. Resultados

Identificación de los casos. (Arteritis de Takayasu)

Un total de 45 casos con AT cumplieron con criterios del ACR:

Eliminados: 12 casos, de los cuales 2 no se conservaron en condiciones adecuadas y en 10 no se obtuvo muestra de DNA suficiente.

Controles con tuberculosis.

Se identificaron 40; de ese total en 7 no se obtuvo información adecuada de su historia y estudios clínicos.

Identificación de Controles con aterosclerosis:

Un total de 96: en 16 se encontró comorbilidad múltiple, en 10 no hubo muestra suficiente para DNA y en 17 los datos clínicos no pudieron ser obtenidos.

Por lo que solo se consideraron en el estudio a 53 De los 181 casos y controles seleccionados inicialmente: Sólo 119 cumplieron criterios y características de inclusión: 33 tejidos, correspondieron a Arteritis de Takayasu, 33 a tuberculosis y 53 con aterosclerosis.

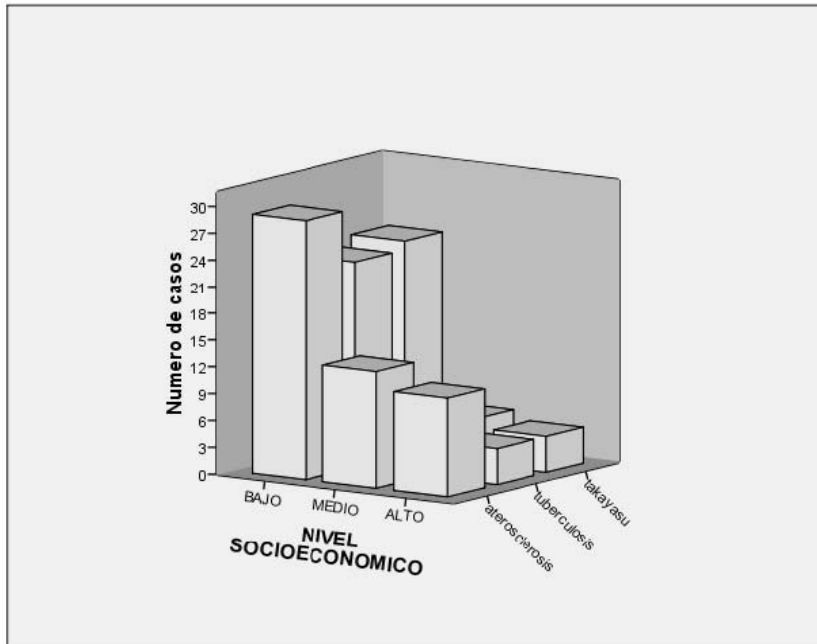
La distribución por género fue:

Casos y controles	Genero		Total
	Hombres	Mujeres	
Takayasu	17 (52)	16 (49)	33
Tuberculosis	21 (64)	12 (36)	33
Aterosclerosis	25 (47)	28 (53)	53

La edad al momento del diagnostico en AT, tuberculosos y con aterosclerosis fue de 22 ± 13 , 22 ± 13 , 57 ± 10 , respectivamente, el nivel socioeconómico fue similar entra AT y tuberculosos y en el grupo de aterosclerosis, tuvieron una tendencia a corresponder a nivel socioeconómico medio y alto, pero sin diferencias entre grupos Figura 12.

Figura 12

Nivel socioeconómico entre casos y controles



Las variables demográficas y tipo de ocupación de estos pacientes se muestran en tablas 4 y 5

Tabla 4 Variables demográficas.

Variables	<i>Arteritis de Takayasu</i> N=33	<i>Control con Tuberculosis</i> N=33	<i>Control con Aterosclerosis</i> N= 53
Edad al diagnóstico (años)	22 ± 13	41 ± 19	57 ± 10
Tiempo de evolución del padecimiento (meses) Rango mínimo máximo	36 2 -468	60 1-336	36 2-288
Edad al momento de la defunción	29 ± 14	49 ± 18	62 ± 10
IMC al momento del fallecimiento	22 ± 6	24 ± 5	27 ± 4
Hipertensión arterial n (%)	26 (79%)	19 (58%)	51 (96%)
Con Dx de tuberculosis n (%)	2	33 (100%)	1
Sin lesiones tuberculosas determinadas en la autopsia	13 (39%)		43 (81%)
Expuestos a pacientes con tb n (%)	7 (22%)	33 (100)	6(12%)
Originarios y residentes de zona endémica conocida para Tb	17 (52%)	19 (57)	37 (69)

Se buscaron datos de aplicación de BCG, o PPD positivos los cuales no fueron consistentes en todos los grupos y por lo tanto no fueron variables que se pudieran evaluar en este estudio.

Tabla 5. Tipo de ocupación entre los casos y controles

Ocupación	CASOS Y CONTROLES			Total
	Takayasu	Tuberculosis	aterosclerosis	
PROFESIONISTA	1	4	7	12
EJECUTIVO	0	0	1	1
COMERCIANTE	2	4	6	12
TRABAJOS HABLES	10	8	12	30
AGRICULTOR/PESCADOR	0	4	4	8
ESTUDIANTE	7*	1	0	8
AMA DE CASA	7	7	21	35
NO RESPUESTA	6	5	2	13
Total	33	33	53	119

* Solo los pacientes con AT mostraron diferencia de mayor frecuencia de estudiantes, lo cual se relaciona con el inicio del padecimiento. También la frecuencia de profesionistas fue mayor en el grupo de aterosclerosis y los de tuberculosis en este ultimo el personal era médico.

Clasificación de la lesión arterial en los tejidos de Arteritis de Takayasu

En la clasificación de los casos con AT, se encontraron con lesión arterial tipo V en 25 casos (76%) de los cuales, 6 no tuvieron involucramiento coronario, 4 fueron tipo V+C, 11 V+C+P y 2 V+P, la distribución del tipo I II y IV, el promedio de la edad al momento de su defunción y el tiempo de evolución del padecimiento se describen en la tabla 6 los detalles de la defunción se describen en la evolución Tabla 7

Tabla 6 -Frecuencia del tipo de lesión arterial, clasificación de los casos de acuerdo a Numano, edad al momento del diagnóstico y evolución del padecimiento.

Tipo de Takayasu	(n)	Edad promedio de los pacientes	Tiempo de evolución
Clasificación Numano.		Mediana (rango años)	Meses Mediana (rango meses)
V+C+P	11	18 (6 a 46)	24 (2 a 468)
V+P	3	18 (10 a 22)	108 (96 a 132)
V+C	4	13 (8 a 17)	24 (12 a 60)
V	7	24 (7 a 46)	24 (12 a 216)
IV+C+P	2	32 (29 a 36)	78 (36 a 120)
IV+C	2	13 (4 a 23)	210 (120 y 130)
Ila+C+P	2	28 (12 a 45)	78 (36 y 120)
I+C	1	28	120
Ilb+C+P	1	30	2

Tabla 7. Características y clasificación de Numano de pacientes con Arteritis de Takayasu

Numero de caso	Edad al diagnostico	Tipo de Takayasu	Evolución en meses	Edadde defuncion	Dx
1	4	IV + C	300	29	ICC edema pulmonar
2	44	V + C+ P	12	45	EVC
3	30	V+C+ P	24	32	ICC
4	10	V+ P	96	18	ICC Edema pulmonar
5	24	V	132	35	IAo
6	22	V+P	108	31	TEP ICC
7	28	I+ C	120	38	IAM
8	15	V+ C + P	24	17	MCD
9	46	V	36	49	ICC EVC
10	40	V	12	41	MCD ICC
11	13	V+C	24	15	IRCT ICC
12	9	V+ C+ P	12	10	IRCT edema pulmonar
13	6	V+ C+P	2	6	IAM
14	16	V	12	17	Paro cardiorespiratorio
15	30	IIb	2	30	IAM
16	18	V + C+P	96	26	EVC
17	12	V+C	12	13	Crisis hipertensiva
18	18	I+P	132	29	HAP TEP
19	10	V+C+P	468	49	IRCT IAM
20	12	IIa+C+P	48	16	Miocarditis
21	20	V	216	38	IRCT
22	46	V+C+P	12	47	Bronconeumonía
23	37	V	24	39	IRCT
24	32	V+C+P	36	35	HAS hemorragia cerebral
25	23	IV+C	120	33	Bronconeumonía
26	29	IV+C+P	36	32	IT
27	36	IV+C+P	120	46	IAo
28	7	V	12	8	IRCT
29	38	V+C+P	36	41	IAM
30	8	V+C	60	13	IRCT
31	45	IIa +C+P	120	55	Desgarro aórtico
32	17	V +C	24	19	BAV IAM
33	9	V + C +P	24	11	Choque hipovolemico ruptura aortica

ICC= insuficiencia cardiaca congestiva, EVC= enfermedad vascular cerebral, IAo = insuficiencia aórtica,TEP= tromboembolia pulmonar, IAM = infarto agudo del miocardio, MCD= miocardiopatía dilatada,IRCT= insuficiencia renal crónica terminal, IT= Insuficiencia tricuspídea, BAV= bloqueo auriculoventricular completo.

Clasificación de los controles con tuberculosis.

Las características de la localización de la enfermedad tuberculosa de los controles con tuberculosis se muestran en tabla 8

Tabla 8 Características de los pacientes con tuberculosis

Numero de Caso	Edad al diagnostico	Tiempo de evolución en (meses)	Sitio de la tuberculosis	Causa de defunción
1	41	144	miliar	Fibrilación ventricular (+)
2	32	60	pulmón riñón	IRCT (+)
3	58	120	pulmón	Choque cardiogenico
4	50	36	pericardio	Bronconeumonía
5	21	36	pulmón	ICC TEP pericarditis
6	59	60	miliar	Tiroiditis tormenta
7	70	96	ganglionar	TEP masiva
8	51	3	meningitis tuberculosa	Septicemia, FV
9	18	1	pulmón	Choque cardiogénico IAM
10	28	336	pulmón	IRCT
11	23	288	pulmón	HAP
12	42	12	pulmón	Endocarditis
13	40	144	pulmón, riñón	IAo severa, IAM
14	58	24	pulmón	Edema agudo pulmonar
15	49	2	pulmón	FVM IAM
16	11	156	pulmón	Meningitis edema cerebral
17	10	60	pulmón, ganglionar	Infarto cerebral HAS maligna
18	26	36	pulmón	TEP
19	40	192	pulmón, glándulas suprarrenales	IAM
20	20	300	pulmón aneurisma roto	Choque hipovolemico
21	8	120	pulmón	IRCT HAS maligna
22	33	288	miliar, tamponade	Tamponade
23	53	252	pulmón	Paro cardiorespiratorio
24	48	24	miliar	Falla organica multiple
25	59	96	pulmón	IAm anterolateral
26	30	12	pulmón	Fibrilacion ventricular
27	69	3	pulmón aorta abdominal	IRCT broconeumonia
28	22	132	pulmón	Edema agudo pulmonar
29	26	144	pulmón, meningitis	Enclavamiento de amígdalas
30	52	12	pulmón	Tamponade
31	55	144	pulmón	PO RVC reinfarto
32	79	4	pulmón	Aneurisma abdominal roto
33	62	3	pulmón y riñón	IRCT hemorragia cerebral

IRCT hemorragia cerebral IRCT= insuficiencia renal crónico terminal, ICC= Insuficiencia cardiaca congestiva, TEP= tromboembolia pulmonar, IAM= infarto agudo del miocardio, HAP= hipertensión arterial pulmonar, IAo= Insuficiencia aórtica, FVM= fibrilación auricular mono mórfica, HAS= hipertensión arterial sistémica.

En los casos con aterosclerosis, 51 pacientes (96%) tenían hipertensión arterial, sobrepeso con promedios de 27 ± 4 vs 22 ± 6 y 24 ± 5 de AT y Tb, con $p= 0.000$ y de 0.007 respectivamente; fue establecida la dislipidemia, (93%) consumo de tabaco (64%), así como vida sedentaria en todos.

Los hallazgos de sitio con tuberculosis reportado durante la autopsia en los casos con Arteritis de Takayasu y controles con aterosclerosis se muestran en tabla 9

Tabla 9.- Tipo de localización de lesiones tuberculosas encontradas en los tejidos estudiados de casos y controles.

Casos y controles	Tipo de lesión	Frecuencia	%	P RM (IC)
	No se encontró	13	39	0.0000 RM 6.6 IC 95%(6.6 -20)*
Takayasu	Pulmón	6	18	
	Foco de Ghon	2	6	
	Pulmón y peri pancreático	2	6	
	Pulmón y riñón	2	6	
	Mediastino	2	6	
	Meningitis tuberculosa	1	3	
	Aneurisma pulmonar	1	3	
	Desgarro en la aorta pericardio	1	3	
	Nódulo en pulmón	1	3	
	Historia 10 años hemoptisis	1	3	
Aterosclerosis*	No se encontró	43	81	
	Pulmón	5	9	
	Pulmón y riñón	1	2	
	Pulmón (curado por HC)	1	2	
	Complejo de Ghon	1	2	
	Cuello	1	2	
	Riñón	1	2	
Total		86		

En 81 % de los casos con aterosclerosis no se encontró lesión tuberculosa, esto mostró diferencia estadística*. En los casos con aterosclerosis, en 51 pacientes (96%) se consignó historia de hipertensión arterial pudo estimarse sobrepeso por el cálculo de peso y talla consignado en el expediente. Dislipidemia: Este dato clínico fue referido en la historia de los pacientes con aterosclerosis; variables de laboratorio como colesterol, triglicéridos, HDL y LDL no pudieron obtenerse en todos por lo que esta variable solo se

evaluó en aquellos que se menciona en la historia y se encontró en 40 (75%). El hábito de consumo de tabaco, fue encontrado en 34 (64%)

Los síntomas que presentaban casos y controles tuvieron predominio cardiovascular, razón por la que fueron aceptados a su ingreso en la Institución, sin embargo se analizaron los expedientes de los cuales se pudo obtener la frecuencia de síntomas diferentes durante la evolución de su padecimiento. Estos son mostrados en la Tabla 10

Tabla 10. Frecuencia de síntomas presentados al momento del ingreso de casos y controles en el área de urgencias.

	Takayasu	Tuberculosis	Aterosclerosis
	n (%)	n (%)	n (%)
Sincope	7 (21)	1 (3)	0
Cefalea	3	1	2
Palpitaciones	5	2	2
Angina	10	10	23
Disnea	20	9	20
Hemoptisis	6	9	0
Hipertensión	26	19	51
IAM	8	8	26
EVC	2	5	0
Infeccioso	3	5	10
TEP	3	3	2
Diseccción aortica	4	5	4
Disfunción valvular	3	1	2
Edema agudo pulmonar	7	2	0
Insuficiencia renal crónica Terminal	8	3	1
Choque cardiogénico	1	2	8
Arritmia	0	2	2
Aneurisma roto	2	2	4

Fue evidente en el grupo de Aterosclerosis que la frecuencia de infarto agudo del miocardio estuviera incrementada; por otro lado, por ser el Instituto un centro de referencia de atención cardiológica, además de la presencia de aterosclerosis en estos controles, se encuentra el sesgo de envío por daño cardiovascular, lo cual incrementa las frecuencias, esto aplica también en casos y controles, este análisis se muestra en Tabla 11.

Tabla 11 Porcentajes de padecimientos como causa de la defunción

	Takayasu	Tuberculosis	Aterosclerosis	p
	N=33 (%)	N=33 (%)	N=53 (%)	
Infarto del miocardio	8 (24)	8 (24)	26 (49)*	0.04 RM = 3 (IC 1.05 – 8.84)
IRCT	8 (24)**	3 (9)	0	0.00 (Fisher)
Enfermedad vascular cerebral	2 (6)	4 (12)	0	NS
Infeccioso	2 (6)	5 (15)	10 (19)	NS
TEP	3 (9)	3 (9)	2 (4)	NS
Disfunción valvular	3 (9)	5 (15)	4 (8)	NS
Choque cardiogénico.	1 (3)	0	7 (13)	NS
Aneurisma aortico roto	2 (6)	2 (6)	2 (4)	NS
Endocarditis bacteriana	0	1 (3)	0	NS
Tamponade	0	2 (3)	0	NS
Revascularizacion complicada	0	0	2 (4%)	

Las causas de defunción en AT se muestran en tabla 12

Tabla 12

Tipo de Takayasu (Numano)	n (%)	Edad al inicio del padecimiento	Tiempo de evolución en meses	Diagnósticos de defunción
V+C+P	11 (33)	44	12	EVC
		30	24	ICC hemoptisis, choque hipovolemico
		15	24	Aneurisma del VI ICC hemoptisis
		6	2	IAM
		18	96	infarto pulmonar EVC embolico
		10	468	IRCT IAM
		46	12	Bronconeumonía de focos múltiples
		32	36	Cardiopatía hipertensiva hemorragia cerebral
		38	36	IAM transmural
		9	24	Ruptura aneurisma carotideo choque hipovolemico
		9	12	Edema agudo pulmonar HCVI
V	7(21)	24	132	I Ao, paro cardiorespiratorio
		46	36	ICC tuberculosis pulmonar, meningitis tb
		40	12	MCD Edema agudo pulmonar
		16	12	DLAo +LES
		20	216	IRCT
		37	24	Síndrome Urémico, Edema agudo pulmonar
		7	12	IRCT, MCD. Edema agudo pulmonar
V+C	4 (12)	13	24	ICC, IRCT caquexia cardiaca
		12	12	ICC Crisis hipertensiva, encefalopatía.
		8	60	IRCT crisis hipertensiva
V+P	3 (9)	17	24	DLAo ruptura del septum membranoso
		10	96	ICC Edema agudo pulmonar
		22	108	ICC TEP múltiple
IV+C	2 (6)	18	132	TEP, HAP.
		4	30	IAM e Insuficiencia cardiaca
IV+C+P	2 (6)	23	120	IRCT síndrome urémico.
		29	36	Insuficiencia tricúspide, pericarditis
IIa+C+P	2(6)	36	120	Insuficiencia aórtica
		12	48	Miocarditis y coartación aortica
I+C	1 (3)	45	120	Desgarro de la aorta choque hipovolemico
		28	17	IAM TEP choque cardiogenico
IIb+C+P	1 (3)	30	2	IAM

Tabla 13 muestra el tipo de lesión en coronarias.

Lesión en coronarias		
Casos y controles	Frecuencia	(%)
Takayasu	23	69.7
Tuberculosis	16	48.5
Aterosclerosis	43	81

No se encontraron diferencias en el tiempo de almacenamiento de los tejidos, el promedio fue de 30 ± 11 para AT, 25 ± 11 para los controles con tuberculosis y de 23 ± 9 para los de aterosclerosis. Los sitios reportados en la autopsia con lesiones y daño de relevancia en la aorta se muestran en la tabla 14. La distribución de secuencias positivas de acuerdo al sitio de lesión aortica se muestran en tabla 15

Tabla 14, SITIOS DE LESION ORTICA REPORTADOS EN LA OBSERVACION MACROSCOPICA DURANTE LA AUTOPSIA

	CASOS Y CONTROLES			Total
	Takayasu	tuberculosis	aterosclerosis	
NO TUVIERON	0	8	2	10
AORTA ASCENDENTE	5	0	1	6
AORTA DESCENDENTE	0	2	4	6
AORTA ABDOMINAL	7	11	27	45
EN TODAS	21	12	19	52
Total	33	33	53	119

Tabla 15

Sitio de la lesión aortica	Sitio de la lesión aortica	Secuencias IS6110+ HupB (tb)		Total
		negativa	positiva	
Arteritis de Takayasu	Aorta ascendente	3	2	5
	Aorta abdominal	1	6	7
	Todo el trayecto	6	15	21
	Total (%)	10 (30)	23 (69.7)	33
Control con tuberculosis	Sin lesión aortica	2	6	8
	Aorta ascendente	0	2	2
	Aorta abdominal	3	8	11
	Todo el trayecto	1	11	12
Total (%)	6 (18)	27 (82)	33	
Control con Aterosclerosis	Sin lesión aortica	1	1	2
	Aorta ascendente	0	1	1
	Descendente	3	1	4
	Abdominal	20	7	27
	Todo el trayecto	10	9	19
Total (%)	34 (64)	19 (36)	53	

La frecuencia de secuencias positivas de acuerdo a la clasificación de Numano se muestra en tabla 16

Tabla 16 Secuencias IS6110+ Total HupB (tb)

	negativa n (%)	positiva n (%)	
Tipo 1	1	2	3
Tipo IIa	2	0	2
Tipo IIb	0	1	1
Tipo IV	2	2	4
Tipo V	5	18	23
	10 (30)	23 (69.6)	33 (100)

TEJIDOS.

La correlación (ínter observador) evaluado entre ambos biólogos para el reporte de las secuencias IS6110, Kappa 94%, para las secuencias del gen HupB (anidada) 80%. Concordancia intraobservador 90%. Los resultados positivos de las secuencias del *gen IS6110* y del *gen HupB* que identifican a *M. tuberculosis* fueron positivas en los controles

con tuberculosis en 82% y en arteritis de Takayasu en 69% sin diferencias estadísticas entre casos con AT y controles positivos y ambos grupos mostraron diferencias con el grupo control con aterosclerosis Tabla 17. El hallazgo para la detección de *M. Bovis* se muestra en la tabla 18

Tabla 17. Frecuencia de repeticiones en tándem positivas entre casos y controles

Pruebas positivas para las secuencias del IS6110 y PCR anidada para (<i>M. tuberculosis</i>): entre casos y controles.					
Casos y controles	Prueba	Frecuencia	(%)	p	RM (IC)
Takayasu* n = 33	Negativa	10	30.3	0.004	4.12 (1.48-11.6)*** NS**
	Positiva	23	69.7		
Tuberculosis** n =33	Negativa	6	18.2	0.0000	8.05 (2.56- 26.5)***
	Positiva	27	81.8		
Aterosclerosis*** n =53	Negativa	34	64.2		
	Positiva	19	35.8		

Tabla 18. Frecuencia de secuencias positivas entre casos y controles

Pruebas positivas para (*M. Bovis*): entre los casos y controles fue:

Takayasu*	Negativa	21	63.6	NS
n = 33	Positiva	12	36.4	
Tuberculosis**	Negativa	18	54.5	NS
n =33	Positiva	15	45.5	
Aterosclerosis***	Negativa	35	66	NS
n =53	Positiva	18	34	

En AT las lesiones arteriales se localizaron en la adventicia hasta en 71% con diferencia respecto a tuberculosis, 17 casos en AT vs. 2 aterosclerosis, $p=0.0000$, los controles con aterosclerosis mostraron daño en la íntima en 46 vs. 9 en AT: $p= 0.000$ con RM de 4.7 e IC95% de (1.6-13.8) y 14 en Tb $p= 0.08$. Tabla 19

Tabla 19. Frecuencia de daño en la capa aortica entre casos y controles

Casos y controles	Íntima n (%)	Media	Adventicia Para	Todas%)	Ninguna
Takayasu	9 (27)	2 (6)	17 (52)	5 (15)	0
N=33					
Tuberculosis	14 (42)	1 (3)	2 (6)	2 (6)	14 (42)
N=33					
Aterosclerosis	46 (86)	4 (7)	2 (4)	1 (2)	0
N=53					

Para el evaluar si el tiempo de evolución del padecimiento de casos y controles tenía relación con el tipo del daño arterial, se realizó una ANOVA que no mostró diferencias significativas en los grupos de lesión arterial

En la exploración macroscópica reportada por el Patólogo, se reporto fibrosis en tejidos. La fibrosis en AT 22 (66%) y para tuberculosis y aterosclerosis en 12 (33%) y 35 (66%) Para el grupo AT vs. Tuberculosis con $p= 0.02$ RM 3.5 IC95%(1.1-11) Aterosclerosis vs. AT = NS Aterosclerosis vs. Tuberculosis con $p= 0.018$ RM 3.2 IC95% (1.19-8).

El infiltrado inflamatorio se encontró incrementado en AT y se muestra en Tabla 20

Tabla 20. Frecuencia del infiltrado inflamatorio en la aorta.

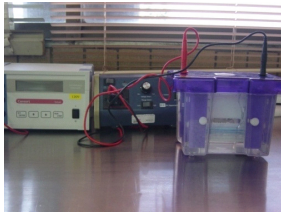
Casos y controles	Sin infiltrado	Con infiltrado	P
	N (%)	N (%)	
Takayasu	9 (27)	24 (73)	0.003 * RM 5.3 (1.6-18)* 0.00006** RM 7.4 (2.5-22)**
Tuberculosis	22 (66)	11 (33)*	
Aterosclerosis	39 (73)	14 (27)**	

Los casos fueron almacenados con su número de código, el tipo de infiltrado y los hallazgos de la presencia o no de las secuencias de cada gen de *M. Tuberculosis* o *M. Bovis* como se muestran en las figura 13 y 14.

Los casos fueron reportados con su número de código, el tipo de infiltrado y los hallazgos de la presencia o no del gen de *M Tuberculosis* o *M Bovis*. Figuras 15 y 16

Figura 13

Mycobacterium tuberculosis
IS6110 gene



Electroforesis en acrilamida al 12%
80 V/ 3.5 hrs

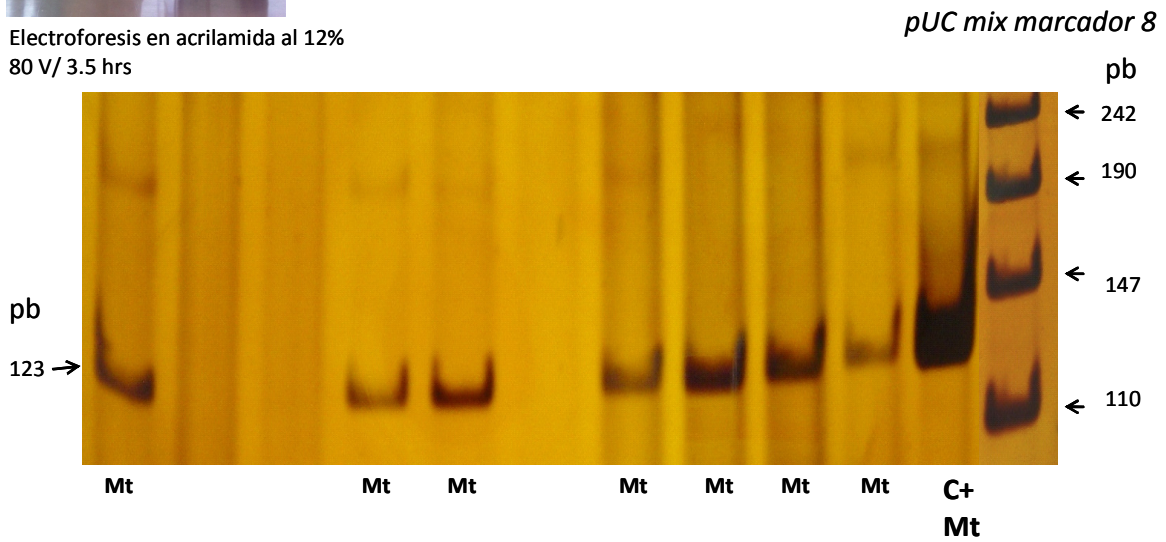


Figura 14

Determinación de *Mycobacterium bovis*
hupB gene



Electroforesis en acrilamida al 12%
80 V/ 3.5 hrs

Tinción de plata

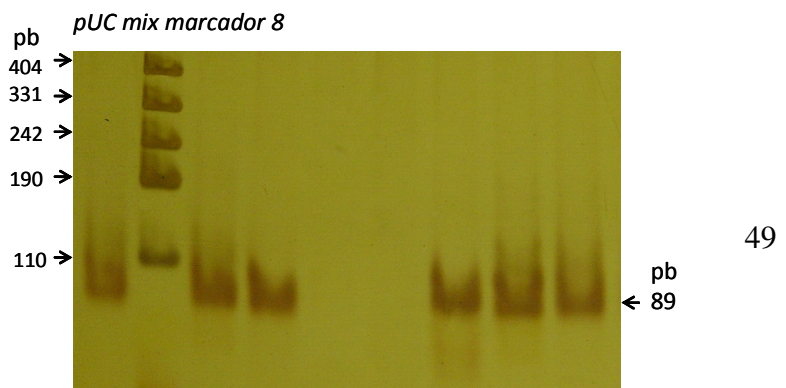
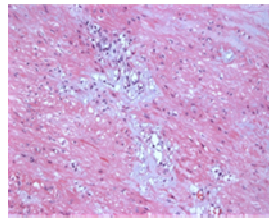
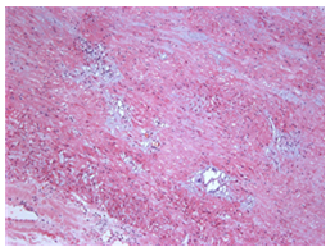
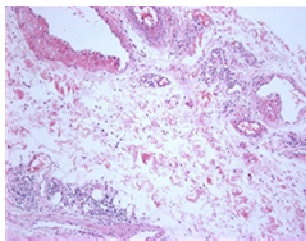
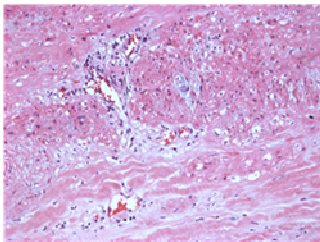


Figura 15

Código 48



Mujer 12 años de edad al Dx:
Takayasu Tipo I + C + P
Nivel 5 socioeconómico bajo, ocupación servicio
en casa, síntomas: palpitaciones.
Daño aórtico: ascendente, descendente abdominal
Adventicia. Foco de Ghon,
defunción a los 16 años

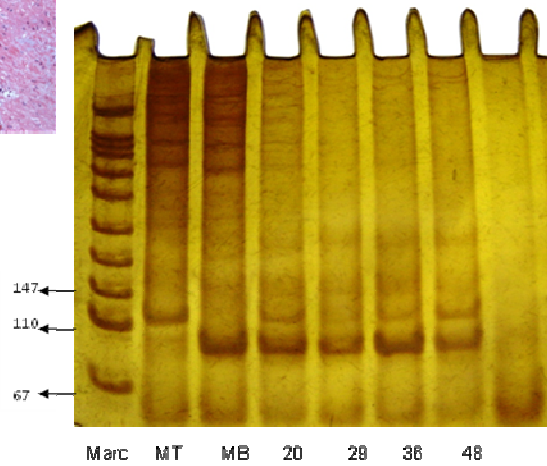
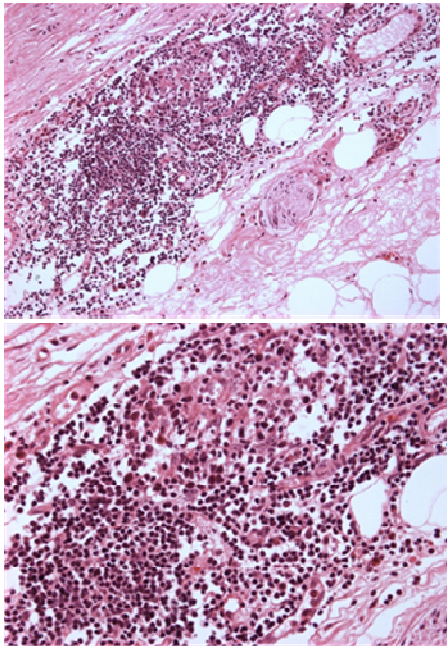
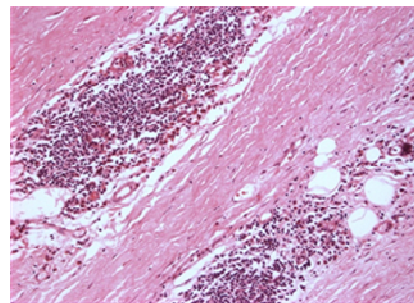


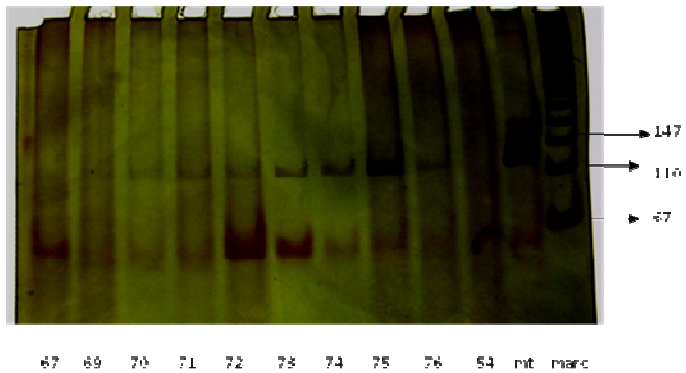
Figura 16



Tuberculosis pulmonar calcificada
18 años fallecio 18 años, disnea
Choque cardiogenico IAM Fam con tb)



CODIGO 69



Resultado del análisis estadístico

Si las secuencias identificadas las consideramos como una variable dependiente y como variables independientes: zona endémica, nivel socioeconómico, edad al momento del inicio del padecimiento exposición con tuberculosis e IMC y lo analizamos mediante un análisis de regresión logística, encontramos que la exposición con tuberculosis es muy significativa.

La exposición:Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1a	Exposición	1.473	.428	11.856	1	.001	4.364
	Constant	-.192	.235	.669	1	.413	.825

Si también tomamos en cuenta como variable dependiente la presencia de granulomas. y como independientes las mismas variables de exposición, nos reporta que la exposición tiene mayor significancia,

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1a	expuesto	2.081	.444	22.008	1	.000	8.010
	Constant	-1.729	.327	27.936	1	.000	.177

a. Variable(s) entered on step 1: expuesto.

Si la extensión del daño aórtico también la consideramos como variable dependiente e integramos como variable independiente a las secuencias, estas tienen significancia.

El daño en todo el trayecto aórtico estuvo relacionado con la presencia de las secuencias asociadas a micobacteria.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1a						
Ambas						
Secuencias gen IS6110 y HupB	.827	.397	4.340	1	.037	2.288
Constant	-.568	.304	3.501	1	.061	.567

a. Variable(s) entered on step 1: tbpos2.

Si incluimos las mismas variables independientes e incluimos la presencia de hipertensión arterial y la edad para predecir daño renal, la edad podría considerarse un factor de riesgo.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1a						
edadx	-.032	.011	8.385	1	.004	.969
Constant	.330	.470	.493	1	.483	1.391

a. Variable(s) entered on step 1: edadx. En relación a los síntomas

a. Variable(s) entered on step 1: expuesto. Para la presencia de Hemoptisis: como variable dependiente y como variables independientes: Zona endémica, edad, exposición, nivel, presencia de las secuencias. Exposición y edad son las variables de importancia

bles E	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1a edadx	-.074	.019	15.036	1	.000	.928
Constant	.529	.571	.858	1	.354	1.697
Step 2b						
expuesto edadx	-.080	.021	14.134	1	.000	.923
	1.503	.675	4.956	1	.026	4.495
Constant	-.100	.669	.022	1	.882	.905

a. Variable(s) entered on step 1: edadx.

b. Variable(s) entered on step 2: expuesto.

Tomando a la disnea como un síntoma de desenlace la edad es un factor asociado.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1a						
edadx	-.022	.010	4.951	1	.026	.978
Constant	.588	.455	1.669	1	.196	1.800

a. Variable(s) entered on step 1: edadx.

Durante el análisis bivariado, las variables a considerar con relevancia estadística fueron las siguientes: la edad al momento del diagnóstico, zona endémica, exposición a paciente con tuberculosis nivel socioeconómico y el índice de masa corporal, tipo de tuberculosis (pulmonar, extra pulmonar, combinada, miliar, meningitis) presencia de granuloma, lesión en capa arterial(intima media, media, adventicia, en todas) infiltrado inflamatorio, de las cuales las 5 primeras fueron consideradas predictoras y las siguientes con el efecto.

Un estudio de correlación canónica, del cual las variables efecto fueron:

1) Tipo de daño tuberculoso encontrado en la autopsia (tipotb); 2) Presencia de ambos genes las secuencias del gen *HupB* y las repeticiones en tándem del IS6110 (tbpos2); 3) Tipo de capa arterial lesionado (aortacap); 4) Presencia de granulomas (granulom); 5) Tipo de enfermedad.

Las variables predictoras fueron: 1) Nivel socioeconómico (nivel); 2) Exposición a pacientes con tuberculosis (expuesto); 3) Índice de masa corporal (IMC); 4) Edad (); 5) Tiempo de evolución del padecimiento (Tievmess).

La correlación canónica alcanzada fue de 87% y el test de Wilk's Lambda con una prueba $F = .0000$ y la prueba de Lawley Hotteling trace y de Loy's largest root con igual significancia estadística, como se muestra en Tabla 21.

Tabla 21

Analisis por correlación canonica

Variables Coefficient P value 95% CI Can λ Corr

Type of tuberculosis	-0.155	0.006	-0.264; -0.045	0.8704
<i>gen IS6110+ HupB</i>	-0.485	0.000	-0.705; -0.265	
location of aortic injury	-0.192	0.000	-0.285; -0.098	
Tipo de enfermedad	0.037	0.000	0.031; 0.043	
presence granuloma	-0.311	0.025	-0.581; -0.041	
socio-economic level	0.188	0.011	0.044; 0.332	
Exposed	-0.333	0.004	-0.556; -0.110	
Body mass index	0.054	0.000	0.032; 0.075	
Age	0.903	0.000	0.762; 1.044	
time of evolution in months	-0.001	0.021	-0.003; -0.0002	
Type of tuberculosis	0.565	0.000	0.361; 0.769	0.0000
<i>gen IS6110+ HupB</i>	0.472	0.024	0.063; 0.881	
location of the aortic injury	-0.482	0.000	-0.656; -0.308	
Tipo de enfermedad	0.011	NS	-0.0002; 0.0214	
presence of granuloma	0.485	NS	-0.017; 0.987	
socio-economic level	-0.178	NS	-0.445; 0.089	
Exposed	1.976	0.000	1.562; 2.390	
Body mass index	-0.015	NS	-0.055; 0.025	
Age	0.525	0.000	0.263; 0.786	
time of evolution in months	-0.0004	NS	-0.003; 0.002	

Type of tuberculosis (pulmonary, extrapulmonary, both, miliary) Aortic injury (intima, media adventitia, all. socio-economic level: stop, low mean

19. Discusión.

En 1963 se hizo mención de los casos presentados por Nasu, cuyos hallazgos histopatológicos se consideraron suficientes para asegurar una posible etiología tuberculosa; sin embargo, el estudio se realizó en 8 casos y se encontró un caso con tuberculosis pulmonar, 3 con localización pulmonar y de otra región y 4 extra pulmonares (176).

La asociación de tuberculosis y arteritis ha sido observada en todo el mundo (177-179). En México desde 1971 se consideró por hallazgos histopatológicos post mortem, que la relación de AT con infección tuberculosa podría tratarse de una asociación real y no de simple coincidencia (44,177).

En esta serie un total de 6 (18%) de los casos con AT fueron encontrados durante la autopsia con lesión pulmonar, de ese total se encontró que en 4 casos las secuencias de *gen IS6110* y del *gen HupB* estaban positivas.

En los casos de AT y del grupo control con tuberculosis identificamos en la descripción macroscópica de la autopsia datos que describen lesiones combinadas en pulmón y riñón y los resultados de las secuencias buscadas del gen de mico bacteria estuvieron presentes en el 100%. También en el grupo control con tuberculosis, se identificaron 4 con meningitis y 4 con tuberculosis miliar y en tres de ellos estuvieron presentes (positivas) las secuencias de los genes buscados.

En casos con AT en donde se han identificado lesiones tuberculosas en la aorta, se han descrito que hasta en 35% de ellos también tenían lesiones en órganos y tejidos distantes a dicha lesión, (180).

En nuestros hallazgos las lesiones encontradas en la aorta y en sitios distantes fueron en un total de 16 casos (48%) y en 12 (75%) de ellos se encontraron positivas las secuencias buscadas.

En seis de los casos con AT, en cuya historia clínica se describía que cursaron con hemoptisis hasta el momento de su fallecimiento no tenían un diagnóstico de tuberculosis, se observó lo siguiente en el reporte anatomopatológico:

Una mujer fue reportada mediante el estudio histopatológico con pericarditis tuberculosa y foco de Ghon en la historia del expediente clínico; se informó que ella había tenido un familiar con tuberculosis activa; en el detalle de la autopsia se encontró una

lesión en la aorta e infiltrado inflamatorio en la adventicia.

El 2° caso con hemoptisis, se trató de un niño de 9 años que llegó con encefalopatía hipertensiva; se demostró durante la autopsia estenosis de la arteria renal izquierda, lesiones granulomatosas en la aorta y linfadenitis tuberculosa pulmonar.

El tercer caso se trató de una mujer que ingresó con disfonía, disnea, angina de pecho, palpitaciones, tos productiva y hemoptisis; tuvo a su ingreso hipertensión arterial sistémica y se encontró en los estudios integrales disección aortica, se sometió a intervención quirúrgica, presentó desgarró en la aorta ascendente, en la autopsia se documenta presencia de granulomas y falleció por sangrado masivo.

El cuarto caso, ingresó por hemoptisis, la Rx de tórax mostraba un nódulo pulmonar, tenía fiebre, falleció por complicación de neumonía adquirida en la comunidad, se encontró lesión tuberculosa en suprarrenales.

Los dos casos siguientes tuvieron reporte de lesión sospechosa de tuberculosis y fueron positivos en los cultivos.

Se encontró en el reporte de 3 autopsias de pacientes con AT, de granulomas del pulmón o foco de Ghon; estas lesiones, -como se conoce-, se han relacionado con infección o enfermedad tuberculosa resuelta; sin embargo en esta serie, en dos de ellos se identificaron secuencias positivas de los genes buscados, en uno de los casos correspondía a un niño de 10 años, cuya causa del fallecimiento fue edema agudo pulmonar, en la autopsia se encontraron ganglios peri pancreáticos tuberculosos y el otro caso de una niña de 12 años que fue recibida con insuficiencia cardiaca congestiva y anasarca se documentó Miocarditis y el otro caso que cursó con hemoptisis, falleció por bronconeumonía adquirida en la comunidad .

Dentro de los reportes histopatológicos, en la literatura destaca el descrito en 1978 en nuestro Instituto, donde incluyeron 18 casos; en ese estudio hacen énfasis en que la presentación del daño aórtico fue diferente a la reportada en Japón, notaron que la extensión del daño arterial era más extenso y tuvieron alta incidencia de hipertensión, además el daño coronario fue referido en 33%, infarto agudo del miocardio en 50% (181); sin embargo cabe resumir que, dado que el objetivo de ese estudio era detectar la prevalencia de trastornos cardiovasculares, los resultados podrían ser considerados con sesgo debido a que es un centro de referencia con atención especializada en enfermedades cardiacas; de ese reporte únicamente coincide con nuestros hallazgos en

cuanto a que el daño en la aorta era extenso a todo el trayecto, que en esta serie fue en 21(67%).

Sharma en 1998 describió 10 casos de autopsia; el daño arterial fue localizado en la aorta abdominal, reporta sitios con actividad, con actividad y fibrosis y otros con únicamente fibrosis, las causas de muerte fueron falla cardiaca congestiva en 4, insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en 2, sangrado intracraneal uno y ruptura de aneurisma uno, encontró tuberculosis en 4 de los pacientes y hace énfasis en que tenían actividad silente del padecimiento y había actividad inflamatoria persistente.(182).

En esta serie se encontró que la causa principal de fallecimiento fue el infarto agudo del miocardio e IRCT y de 24 casos que estaban activos solo 3 (13%) se consideraban activos en ese momento de la evaluación clínica y de los demás casos que fueron considerados inactivos fueron activos por estudio histopatológico en un total de 21 (87%) lo que apoya que hay actividad subclínica del padecimiento.

Existen informes de casos aislados, de los cuales en uno se informó una relación de AT y positividad de las pruebas de PPD y de bacteria ácido alcohol resistente en orina (BAAR) (183), en otro se describe enfermedad coincidente de lesión arterial y tuberculosis diseminada, en donde 4 años antes del padecimiento el paciente contaba con un estudio de tomografía computada que no mostraba lesión aórtica (184); de manera más reciente, hay reportes que no encontraron asociación con tuberculosis e informan que solo 8.5% casos presentaron tuberculosis y se consideró coincidente; ese estudio fue retrospectivo, con análisis de estudios y resultados de laboratorio basados en informes del expediente pero no en tejidos de autopsia (185). En otro estudio se incluyó un número importante de pacientes y se encontró que en 20% de los casos se encontraron datos convincentes de tuberculosis; fue un estudio de análisis retrospectivo sobre los expedientes, pero sin estudio en tejido aortico (186).

La hipótesis de que *Micobacterium tuberculosis* tiene capacidad para generar infección latente surge en el siglo XX; se ha estimado que más de un tercio de la población mundial podría tener una infección tuberculosa latente y que únicamente el 10% de ellos podría desarrollar tuberculosis, que un 5% de la población infectada desarrollaría enfermedad después de 5 años y el otro tanto al momento de la infección (47).

Se sabe que la tuberculosis primaria aparece cuando hay una formación de complejo primario en el parénquima pulmonar de ambas bases o linfadenopatía hilar, esta

última relacionada con una dosis baja de infección (187).

Por anatomía las zonas bajas y medias del pulmón son más propensas a infección que las zonas apicales debido a su volumen, aunque algunas veces la ventilación parece ser favorecida al último (188).

Esto parece apoyarse por las observaciones de lesiones solitarias primarias y calcificadas en las necropsias, de las cuales 66% de las infecciones se localizaron en la mitad más baja del pulmón y únicamente 12% fueron supraclaviculares (189).

La diseminación hematológica es observada después de la infección inicial (190) y se sabe que el complejo primario se resuelve espontáneamente sin síntomas en el 95% de la gente infectada, pero el 5% que desarrolla la enfermedad puede ser local y causar derrame pleural, puede ser sistémica o meníngea o miliar y ha sido aceptado que la forma cavitada post-primaria localizada en la zona apical de los pulmones ha sido asociada con reactivación de una lesión vieja que contenía el bacilo latente (51,191) aunque hay una teoría de la presencia de un bacilo dormido constantemente relacionado con el sistema inmune, esperando reactivarse después de que el hospedero cursa con inmunosupresión; hay escepticismo en esta idea debido a que en la mayoría de los casos el complejo primario es estéril dentro de 5 años y la otra posibilidad es que las zonas metastásicas que provienen de un complejo primario pueden cursar con menor concentración bacilar que el foco original, por lo que una posibilidad del origen de la tuberculosis sería ocasionada por una re infección (51).

Hasta ahora se aceptan evidencias clínicas de la presencia de un bacilo latente, ya que existe reactivación posterior a un periodo largo de tratamiento (192) y hay también hechos que apoyan que hay un límite de tiempo para ese periodo, pero puede concluirse por algunos autores que latencia de *Mycobacterium* puede resultar de un metabolismo bajo del bacilo y el estado latente dependiente del estrés ambiental sufrido, donde el bacilo se adapta, se sospecha que en ambos casos el destino del bacilo latente es determinado por la fisiología dinámica y el tejido donde queda arrestado, cuyo periodo de tiempo no excede a 10 años (193).

Si bien los mecanismos para infección latente a nivel pulmonar, empiezan a ser conocidos es también probado que existen teorías múltiples relacionadas a la asociación con tuberculosis, entre ellas, la susceptibilidad asociada al hospedero, evasión de la respuesta inmune por micro bacteria y de genes relacionados con la respuesta por

macrófagos (194-196).

Debido a la controversia que existe en la asociación de esta vasculitis con una posible infección con *Mycobacterium tuberculosis*, en este estudio el planteamiento metodológico incluyó maniobra cegada al diagnóstico para los investigadores participantes.

En la actualidad son pocos los estudios sistemáticos en relación a esta pregunta de investigación y en la metodología de este estudio se trató de buscar un acercamiento para eliminar el azar.

En relación a las pruebas moleculares actuales, permiten una identificación más cercana para definir micobacteria, estos se han utilizado desde 1994.

Un reporte del Dr. Salo detalla la identificación de *M tuberculosis* en una momia precolombina del Perú (197). La técnica empleada para el estudio molecular en la identificación de secuencias para detectar el complejo *M. Tuberculosis* en tejidos embebidos en parafina ha sido reproducida en varias series (198); el análisis de los polimorfismos de longitud variable (RFLP's) de la secuencia de inserción IS6110 fueron descritos por primera vez en *Mycobacterium tuberculosis* en 1990 (65,66) y el grado de concordancia entre PCR-RFLP ha sido reportada mayor al 90% (199).

Las limitaciones de este tipo de estudios están relacionadas con técnicas de procesamiento y almacenamiento de los tejidos, por lo que en este estudio antes del planteamiento se investigó el proceso de almacenamiento de tejidos y la forma como habían sido elaborados los bloques, tomando como base los requerimientos sugeridos actualmente. No se contó con un control "normal" sin padecimiento, quizás obtenido de pacientes fallecidos en accidentes, de los cuales es menos probable un daño aórtico; sin embargo no está probado que este grupo de pacientes esté sano y en general en un servicio forense la obtención del tejido aórtico es posible; sin embargo, para descartar normalidad o salud en el paciente, se tendría que analizar mediante pruebas de laboratorio o de imagen, lo cual no sería factible realizar en esos casos y la obtención y elaboración de ellos, e incrementaría el costo del proyecto.

Hay sesgo de información en esta serie debido a la imposibilidad de obtener variables de factores adyacentes como lo son: el empleo de vacunas BCG en casos y controles, la posible exposición de los casos y controles tiempo de exposición en zonas endémicas y ocupacionales, inmunosupresión, tratamiento. Sin embargo los hallazgos

son relevantes aún con todas estas limitantes, pues las diferencias son estadísticamente significativas. Finalmente un análisis multivariado, que permite la evaluación lineal de las variables incluidas para este estudio, confirma una correlación significativa entre ellas.

Estos hallazgos conllevan a buscar los posibles mecanismos involucrados para explicar la presencia de lesión tuberculosa en tejido vascular en donde el estrés fisiológico es diferente al observado en el pulmón, en donde la respuesta inflamatoria parece mantenerse de manera subclínica y en donde la evolución del daño conlleva a estenosis en las arterias cuya disfunción, repercute en la sobrevivencia de los pacientes con arteritis de Takayasu.

El tratamiento debe ser replanteado debido a que la sospecha de enfermedad tuberculosa latente en AT es posible; por lo tanto, los blancos terapéuticos tendrían que plantearse con dirección a una enfermedad infecciosa, cuya latencia variable es posible.

Nuestros hallazgos requieren reproducibilidad para evaluar validez externa.

20. Conclusión.

Se identificaron secuencias genes *HupB* y de inserción *IS6110* asociados a *M. tuberculosis* en tejidos de aorta de pacientes con arteritis de Takayasu.

Los hallazgos de lesiones tuberculosas en el tejido aórtico y en sitios distantes, apoyan la sospecha de una asociación con infección tuberculosa. Es posible que el daño arterial sea una manifestación extra pulmonar de tuberculosis. Se requieren estudios por otros grupos para evaluar reproducibilidad.

Los resultados actuales son significativos y permiten plantear nuevas hipótesis de estudio y manejo terapéutico.

Referencias

1. Shelhamer JH, Volkman DJ, Parrillo JE, Lawley TJ, Johnston MR, Fauci AS. Takayasu's arteritis and its therapy. *Ann Intern Med* 1985;103:121-6.
2. Hall S, Barr W, Lie JT, Stanson AW, Kazmier FJ, Hunder GG. Takayasu arteritis. A study of 32 North American patients. *Medicine (Baltimore)* 1985;64:89-99.
3. Lupi-Herrera E, Sanchez-Torres G, Marcushamer J, Mispireta J, Horwitz S, Vela JE. Takayasu's arteritis. Clinical study of 107 cases. *Am Heart J* 1977;93:94-103.
4. Martinez- Baños D, Dabague J, Reyes PA. Arteritis de Takayasu en Mexico, una serie de casos consecutivos. *Rev Mex Reumatol* 1999;14:121-7.
5. CACCAMISE WC, WHITMAN JF. Pulse-less disease; a preliminary case report. *Am Heart J* 1952;44:628-33.
6. Arnaud L, Haroche J, Limal N et al. Takayasu arteritis in France: a single-center retrospective study of 82 cases comparing white, North African, and black patients. *Medicine (Baltimore)* 2010;89:1-17.
7. Soto ME, Espinola N, Flores-Suarez LF, Reyes PA. Takayasu arteritis: clinical features in 110 Mexican Mestizo patients and cardiovascular impact on survival and prognosis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:S9-15.
8. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997;350:430-6.
9. Dal Canto AJ, Virgin HW. Animal models of infection-mediated vasculitis: implications for human disease. *Int J Cardiol* 2000;75 Suppl 1:S37-S45.
10. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1997;35:48-52.
11. Laitinen K, Laurila A, Pyhala L, Leinonen M, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infect Immun* 1997;65:4832-5.
12. Presti RM, Pollock JL, Dal Canto AJ, O'Guin AK, Virgin HW. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med* 1998;188:577-88.
13. Thibault S, Drolet R, Germain MC, D'Allaire S, Laroche R, Magar R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 1998;35:108-16.

14. Virgin HW, Speck SH. Unraveling immunity to gamma-herpesviruses: a new model for understanding the role of immunity in chronic virus infection. *Curr Opin Immunol* 1999;11:371-9.
15. Nowack R, Flores-Suarez LF, van der Woude FJ. New developments in pathogenesis of systemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:3-11.
16. Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA, Hernandez PR. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2002;128:229-37.
17. LEE SH, MCCUNE RM, Jr., MCDERMOTT W, TOMPSETT R, WASZ-HOCKERT O. Resistance of tubercle bacilli to pyrazinamide in vivo. *Am Rev Tuberc* 1956;74:572-80.
18. MCCUNE RM, Jr., TOMPSETT R. Fate of Mycobacterium tuberculosis in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. *J Exp Med* 1956;104:737-62.
19. MCCUNE RM, Jr., MCDERMOTT W, TOMPSETT R. The fate of Mycobacterium tuberculosis in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med* 1956;104:763-802.
20. Phyu S, Mustafa T, Hofstad T, Nilsen R, Fosse R, Bjune G. A mouse model for latent tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 1998;30:59-68.
21. Seko Y, Takahashi N, Tada Y, Yagita H, Okumura K, Nagai R. Restricted usage of T-cell receptor Vgamma-Vdelta genes and expression of costimulatory molecules in Takayasu's arteritis. *Int J Cardiol* 2000;75 Suppl 1:S77-S83.
22. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997;350:430-6.
23. Okuyama K, Yaginuma G, Takahashi T, Sasaki H, Mori S. The development of vasa vasorum of the human aorta in various conditions. A morphometric study. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:721-5.
24. Bickerstaff LK, Pairolero PC, Hollier LH et al. Thoracic aortic aneurysms: a population-based study. *Surgery* 1982;92:1103-8.

25. Svensjo S, Bengtsson H, Bergqvist D. Thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm and dissection: an investigation based on autopsy. *Br J Surg* 1996;83:68-71.
26. Pomerance A, Yacoub MH, Gula G. The surgical pathology of thoracic aortic aneurysms. *Histopathology* 1977;1:257-76.
27. Schutte HE. Changes in the vasa vasorum of the atherosclerotic aortic wall. *Angiologica* 1968;5:210-22.
28. Gadson PF, Jr., Dalton ML, Patterson E et al. Differential response of mesoderm- and neural crest-derived smooth muscle to TGF-beta1: regulation of c-myc and alpha1 (I) procollagen genes. *Exp Cell Res* 1997;230:169-80.
29. Beaucher J, Rodrigue S, Jacques PE, Smith I, Brzezinski R, Gaudreau L. Novel Mycobacterium tuberculosis anti-sigma factor antagonists control sigmaF activity by distinct mechanisms. *Mol Microbiol* 2002;45:1527-40.
30. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
31. Beggs CB, Noakes CJ, Sleigh PA, Fletcher LA, Siddiqi K. The transmission of tuberculosis in confined spaces: an analytical review of alternative epidemiological models. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:1015-26.
32. Pittet D, Allegranzi B, Sax H et al. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis* 2006;6:641-52.
33. Aguilar D, Hanekom M, Mata D et al. Mycobacterium tuberculosis strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis (Edinb)* 2010;90:319-25.
34. Oz MC, Brener BJ, Buda JA et al. A ten-year experience with bacterial aortitis. *J Vasc Surg* 1989;10:439-49.
35. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:585-617.
36. Weyand CM, Goronzy JJ. Multisystem interactions in the pathogenesis of vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:3-11.
37. Numano F. Vasa vasoritis, vasculitis and atherosclerosis. *Int J Cardiol* 2000;75 Suppl 1:S1-S8.

38. Lupi HE, Sanchez TG, Castillo PU. [Cutaneous reactivity to P.P.D. and antigens of atypical mycobacteria (*kansasii* and *fortuitum*) in patients with unespecific arteritis]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1972;42:717-25.
39. Rojas EO, Sanchez TG, Reyes Lopez PA. [Immunologic studies in Takayasu's arteritis. I. Circulating antibodies to mycobacterial products and circulating immune complexes]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1981;51:185-8.
40. Sen PK, Kinare SG, Kelkar MD, Nanivad-Kar SA. Nonspecific stenosing arteritis of the aorta and its branches: a study of a possible etiology. *Mt Sinai J Med* 1972;39:221-42.
41. Sneller MC. Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *Cleve Clin J Med* 2002;69 Suppl 2:SII40-SII43.
42. Yang CD, Teng JL, Gu YY, Chen SL. Takayasu's arteritis presenting with bilateral pulmonary granulomatosis. *Clin Rheumatol* 2007;26:612-4.
43. Sanchez TG, Barroso MR. [Erythema nodosum and Bazin's erythema induratum. Their relation to "inspecific" arteritis]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1971;41:414-23.
44. Sanchez TG, Contreras R, Barroso MR, Zajarias S, Davila R, Lupi HE. [Tuberculous adenitis and Takayasu's arteritis. Clinical and anatomo-pathological aspects]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1972;42:663-71.
45. Divangahi M, Chen M, Gan H et al. Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol* 2009;10:899-906.
46. Thwaites GE, Schoeman JF. Update on tuberculosis of the central nervous system: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Clin Chest Med* 2009;30:745-54, ix.
47. Global tuberculosis control: key findings from the December 2009 WHO report. *Wkly Epidemiol Rec* 2010;85:69-80.
48. Aziz MA, Wright A. The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: a model for other infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 4:S258-S262.
49. Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clin Infect Dis* 2009;49:1350-7.

50. maguer-Chavez J, Ocampo-Candiani J, Rendon A. [Current panorama in the diagnosis of cutaneous tuberculosis]. *Actas Dermosifiliogr* 2009;100:562-70.
51. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun* 2001;69:4195-201.
52. Ellner JJ. Review: the immune response in human tuberculosis--implications for tuberculosis control. *J Infect Dis* 1997;176:1351-9.
53. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:679-91.
54. Stead WW, Lofgren JP. Does the risk of tuberculosis increase in old age? *J Infect Dis* 1983;147:951-5.
55. Blackwell JM. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Int J Parasitol* 1998;28:21-8.
56. Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 1998;16:593-617.
57. Richeldi L, Ewer K, Losi M et al. Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 2004;140:709-13.
58. Picard C, Parrot A, Boussaud V et al. Massive hemoptysis due to Rasmussen aneurysm: detection with helicoidal CT angiography and successful steel coil embolization. *Intensive Care Med* 2003;29:1837-9.
59. De Backer AI, Mortelet KJ, De Keulenaer BL, Verhaert L, Vanstraelen SM, Van Hee RH. Vascular involvement secondary to tuberculosis of the abdomen. *Abdom Imaging* 2005;30:714-8.
60. Long R, Guzman R, Greenberg H, Safneck J, Hershfield E. Tuberculous mycotic aneurysm of the aorta: review of published medical and surgical experience. *Chest* 1999;115:522-31.
61. PARKHURST GF, DEKCKER JP. Bacterial aortitis and mycotic aneurysm of the aorta; a report of twelve cases. *Am J Pathol* 1955;31:821-35.
62. Brosch R, Gordon SV, Billault A et al. Use of a Mycobacterium tuberculosis H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect Immun* 1998;66:2221-9.
63. Philipp WJ, Poulet S, Eiglmeier K et al. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, Mycobacterium tuberculosis H37Rv, and comparison with Mycobacterium leprae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3132-7.

64. Cole ST, Saint G, I. Bacterial genomics. *FEMS Microbiol Rev* 1994;14:139-60.
65. McAdam RA, Hermans PW, van SD et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* 1990;4:1607-13.
66. Rosas-Magallanes V, Deschavanne P, Quintana-Murci L, Brosch R, Gicquel B, Neyrolles O. Horizontal transfer of a virulence operon to the ancestor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol Evol* 2006;23:1129-35.
67. Veyrier F, Pletzer D, Turenne C, Behr MA. Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evol Biol* 2009;9:196.
68. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 1990;18:188.
69. Dale JW. Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur Respir J Suppl* 1995;20:633s-48s.
70. Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1988;26:2240-5.
71. Fan XY, Ma H, Guo J et al. A novel differential expression system for gene modulation in *Mycobacteria*. *Plasmid* 2009;61:39-46.
72. Zainuddin ZF, Dale JW. Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. *J Gen Microbiol* 1989;135:2347-55.
73. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2668-73.
74. Andersen AB, Thybo S, Godfrey-Faussett P, Stoker NG. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:922-7.
75. Beavis KG, Lichty MB, Jungkind DL, Giger O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2582-6.
76. Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991;338:364-6.

77. de WD, Maartens G, Steyn L. A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Tuber Lung Dis* 1992;73:262-7.
78. Fries JW, Patel RJ, Piessens WF, Wirth DF. Genus- and species-specific DNA probes to identify mycobacteria using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1990;4:87-105.
79. Hermans PW, Schuitema AR, van SD et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:1204-13.
80. Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998;36:937-43.
81. Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990;28:1877-80.
82. Singh KK, Nair MD, Radhakrishnan K, Tyagi JS. Utility of PCR assay in diagnosis of en-plaque tuberculoma of the brain. *J Clin Microbiol* 1999;37:467-70.
83. Singh KK, Muralidhar M, Kumar A et al. Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in granulomatous lymphadenopathy. *J Clin Pathol* 2000;53:355-61.
84. Sjobring U, Mecklenburg M, Andersen AB, Miorner H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2200-4.
85. akewaki S, Okuzumi K, Ishiko H, Nakahara K, Ohkubo A, Nagai R. Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1993;31:446-50.
86. Dziadek J, Sajduda A, Borun TM. Specificity of insertion sequence-based PCR assays for mycobacterium tuberculosis complex. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:569-74.
87. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990;161:977-81.
88. Haas WH, Butler WR, Woodley CL, Crawford JT. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1993;31:1293-8.

89. Niyaz Ahmed AS, Khan JR, Ganai NA. DNA amplification assay for rapid detection of bovine tubercle bacilli in semen. *Anim Reprod Sci* 1999;57:15-21.
90. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:152-7.
91. Matsumoto S, Yukitake H, Furugen M, Matsuo T, Mineta T, Yamada T. Identification of a novel DNA-binding protein from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Microbiol Immunol* 1999;43:1027-36.
92. Matsumoto S, Furugen M, Yukitake H, Yamada T. The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein I (MDPI) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000;182:297-301.
93. Prabhakar S, Mishra A, Singhal A et al. Use of the *hupB* gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. *J Clin Microbiol* 2004;42:2724-32.
94. Numano F, Kakuta T. Takayasu arteritis--five doctors in the history of Takayasu arteritis. *Int J Cardiol* 1996;54 Suppl:S1-10.
95. Takayasu M. Case With unusual changes of the central vessels in the retina. *Acta Soc Ophtal Jap* 1908;12:544-55.
96. Shimizu K, Sano K. Pulseless disease. *J Neuropath Clin* 1951;1:37-47.
97. Puig Solanes, Quiroz J. El cuadro ocular de los síndromes del arco aortico. *Ann Soc Mex Oftal* 1957;30:26-33.
98. Waern AU, Andersson P, Hemmingsson A. Takayasu's arteritis: a hospital-region based study on occurrence, treatment and prognosis. *Angiology* 1983;34:311-20.
99. Fujita T, Adachi T, Inamoto H, Amagasaki Y, Kuroda S, Wada T. Hypergammaglobulinemic renal tubular acidosis. Association with Takayasu arteritis. *JAMA* 1975;234:742-3.
100. Eichhorn J, Sima D, Thiele B et al. Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Circulation* 1996;94:2396-401.
101. Praprotnik S, Rozman B, Blank M, Shoenfeld Y. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis. *Wien Klin Wochenschr* 2000;112:660-4.
102. Baltazares M, Mendoza F, Dabague J, Reyes PA. Antiaorta antibodies and Takayasu arteritis. *Int J Cardiol* 1998;66 Suppl 1:S183-S187.

103. Dhingra R, Talwar KK, Chopra P, Kumar R. An enzyme linked immunosorbent assay for detection of anti-aorta antibodies in Takayasu arteritis patients. *Int J Cardiol* 1993;40:237-42.
104. Gyotoku Y, Kakiuchi T, Nonaka Y, Saito Y, Ito I, Murao S. Immune complexes in Takayasu's arteritis. *Clin Exp Immunol* 1981;45:246-52.
105. Sagar S, Ganguly NK, Koicha M, Sharma BK. Immunopathogenesis of Takayasu arteritis. *Heart Vessels Suppl* 1992;7:85-90.
106. Garcia-Torres R, Noel LH, Reyes PA et al. Absence of ANCA in Mexican patients with Takayasu's arteritis. *Scand J Rheumatol* 1997;26:55-7.
107. Nava A, Senecal JL, Banales JL, Raymond I, Reyes PA. Absence of antiphospholipid/co-factor antibodies in Takayasu arteritis. *Int J Cardiol* 2000;75 Suppl 1:S99-S104.
108. Tripathy NK, Sinha N, Nityanand S. Anti-annexin V antibodies in Takayasu's arteritis: prevalence and relationship with disease activity. *Clin Exp Immunol* 2003;134:360-4.
109. Svejgaard A, Platz P, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M. HL-A and disease associations--a survey. *Transplant Rev* 1975;22:3-43.
110. Isohisa I, Numano F, Maezawa H, Sasazuki T. HLA-Bw52 in Takayasu disease. *Tissue Antigens* 1978;12:246-8.
111. Yajima M, Numano F, Park YB, Sagar S. Comparative studies of patients with Takayasu arteritis in Japan, Korea and India--comparison of clinical manifestations, angiography and HLA-B antigen. *Jpn Circ J* 1994;58:9-14.
112. Sattar MA, White AG, Eklof B, Fenech FF. Takayasu's disease in Arabs. *Postgrad Med J* 1985;61:387-90.
113. Volkman DJ, Mann DL, Fauci AS. Association between Takayasu's arteritis and a B-cell alloantigen in North Americans. *N Engl J Med* 1982;306:464-5.
114. Mehra NK, Rajalingam R, Sagar S, Jain S, Sharma BK. Direct role of HLA-B5 in influencing susceptibility to Takayasu aortoarteritis. *Int J Cardiol* 1996;54 Suppl:S71-S79.
115. Castro G, Chavez-Peon C, Sanchez-Torres G, Reyes PA. HLA A and B antigens in Takayasu's arteritis. *Rev Invest Clin* 1982;34:15-7.
116. Vargas-Alarcon G, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J et al. Differences in intron 2 sequences between B*39061 and B*39062 in Amerindians: comparison with those of B*3901, B*5101, and B*52012 alleles. *Immunogenetics* 1997;45:436-9.

117. Girona E, Yamamoto-Furusho JK, Cutino T et al. HLA-DR6 (possibly DRB1*1301) is associated with susceptibility to Takayasu arteritis in Mexicans. *Heart Vessels* 1996;11:277-80.
118. Numano F, Isohisa I, Kishi U, Arita M, Maezawa H. Takayasu's disease in twin sisters. Possible genetic factors. *Circulation* 1978;58:173-7.
119. Numano F, Namba K, Suzuki K, Matsumoto H. Hereditary factors in Takayasu disease. III. Polymorphism of human complements. *Exp Clin Immunogenet* 1989;6:236-44.
120. Isohisa I, Numano F, Nakajo Y, Matsuno A, Yajima M, Maezawa H. [Two sisters with Takayasu disease who have grown separately in different environments]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 1984;73:1342-6.
121. Teran-Escandon D, Teran-Ortiz L, Camarena-Olvera A et al. Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *Chest* 1999;115:428-33.
122. Vargas-Alarcon G, Flores-Dominguez C, Hernandez-Pacheco G et al. Immunogenetics and clinical aspects of Takayasu's arteritis patients in a Mexican Mestizo population. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:439-43.
123. dos Reis Neto ET, Pucinelli ML, Silva de Souza AW, Sato EI. Thoracic outlet syndrome (TOS) mimicking Takayasu's arteritis--case report. *Acta Reumatol Port* 2009;34:96-101.
124. Ishikawa K. Diagnostic approach and proposed criteria for the clinical diagnosis of Takayasu's arteriopathy. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:964-72.
125. Arend WP, Michel BA, Bloch DA et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1129-34.
126. Hata A, Noda M, Moriwaki R, Numano F. Angiographic findings of Takayasu arteritis: new classification. *Int J Cardiol* 1996;54 Suppl:S155-S163.
127. Lande A, Rossi P. The value of total aortography in the diagnosis of Takayasu's arteritis. *Radiology* 1975;114:287-97.
128. Vazquez SJ. [Helical computed tomography in Takayasu's arteritis]. *Arch Cardiol Mex* 2004;74 Suppl 1:S110-S112.

129. Sharma S, Aggarwal S, Talwar KK, Rajani M. Intravenous digital subtraction angiography in non-specific aorto-arteritis. *Br J Radiol* 1989;62:117-20.
130. Ryder HF, Tafe LJ, Burns CM. Fatal aortic dissection due to a fulminant variety of isolated aortitis. *J Clin Rheumatol* 2009;15:295-9.
131. Song MH, Nakayama T, Hattori K, Tokuda Y, Mabuchi Y, Ueda Y. Aortic root aneurysm in Takayasu arteritis syndrome: exploration in active phase and repair in inactive phase. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:1084-5.
132. Ando H, Funabashi N, Uehara M et al. Abnormal collateral arterial systems in Takayasu's arteritis and Leriche's syndrome evaluated by whole body acquisition using multislice computed tomography. *Int J Cardiol* 2007;121:306-8.
133. Dabague J, Reyes PA. Takayasu arteritis in Mexico: a 38-year clinical perspective through literature review. *Int J Cardiol* 1996;54 Suppl:S103-S109.
134. Meave A, Soto ME, Reyes PA et al. Pre-pulseless Takayasu's arteritis evaluated with 18F-FDG positron emission tomography and gadolinium-enhanced magnetic resonance angiography. *Tex Heart Inst J* 2007;34:466-9.
135. Maksimowicz-McKinnon K, Clark TM, Hoffman GS. Limitations of therapy and a guarded prognosis in an American cohort of Takayasu arteritis patients. *Arthritis Rheum* 2007;56:1000-9.
136. Arabidze GG, Abugova SP, Domba GG. Non-specific aortoarteritis. Clinical course and long-term medical treatment. *Int Angiol* 1985;4:165-70.
137. Kuroda T, Ueno M, Sato H et al. A case of Takayasu arteritis complicated with glomerulonephropathy mimicking membranoproliferative glomerulonephritis: a case report and review of the literature. *Rheumatol Int* 2006;27:103-7.
138. de PP, Garcia-Torres R, Uribe N et al. Kidney involvement in Takayasu arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:S10-S14.
139. Hijazi R, Chandar J, Nwobi O, Muneeruddin S, Zilleruelo G, Abitbol CL. Renal manifestations in toddlers with Takayasu's arteritis and malignant hypertension. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1227-30.
140. Weiss RA, Jodorkovsky R, Weiner S et al. Chronic renal failure due to Takayasu's arteritis: recovery of renal function after nine months of dialysis. *Clin Nephrol* 1982;17:104-7.

141. Brunner J, Armstrong D, Feldman BM, Schneider R, Benseler S. Childhood stroke as the presentation of Takayasu's arteritis: diagnostic delay can cause catastrophic complications. *J Rheumatol* 2008;35:1228-30.
142. Park KC, Kim JH, Yoon SS, Heo SH. Takayasu's disease presenting with atherothrombotic ischaemic stroke. *Neurol Sci* 2008;29:363-6.
143. Pfefferkorn T, Bitterling H, Hufner K et al. Malignant hemispheric infarction in Takayasu arteritis. *J Neurol* 2008;255:1425-6.
144. Weiss PF, Corao DA, Pollock AN, Finkel TH, Smith SE. Takayasu arteritis presenting as cerebral aneurysms in an 18 month old: A case report. *Pediatr Rheumatol Online J* 2008;6:4.
145. CACCAMISE WC, OKUDA K. Takayasu's or pulseless disease: an unusual syndrome with ocular manifestations. *Am J Ophthalmol* 1954;37:784-6.
146. Flores-Suarez LF, Simon JA, Reyes PA, Soto ME, Castanon C, Navarro P. Takayasu's arteritis presenting as bilateral cataracts: report of three cases. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1005-7.
147. Kaushik S, Gupta A, Gupta V, Jain S, Lal V. Retinal arterial occlusion in Takayasu's arteritis. *Indian J Ophthalmol* 2005;53:194-6.
148. Kiyosawa M, Baba T. Ophthalmological findings in patients with Takayasu disease. *Int J Cardiol* 1998;66 Suppl 1:S141-S147.
149. Offret H, Foels A, Renard G. [Severe ocular manifestations in a case of Takayasu's disease]. *Bull Soc Ophtalmol Fr* 1981;81:1171-2.
150. Lie JT. Pathology of isolated nonclassical and catastrophic manifestations of Takayasu arteritis. *Int J Cardiol* 1998;66 Suppl 1:S11-S21.
151. Nakajima N, Masuda M, Imamaki M, Ishida A, Tanabe N, Kuriyama T. A case of pulmonary artery bypass surgery for a patient with isolated Takayasu pulmonary arteritis and a review of the literature. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007;13:267-71.
152. Espinola-Zavaleta N, Soto ME, Bauk L et al. Coronary reserve in Takayasu's arteritis: transesophageal echocardiographic analysis. *Echocardiography* 2005;22:593-8.
153. Al-Hulaimi N, Al-Saileek A, Ahmed T, Al-Zaibag M, Pai RG, El-Widaa H. Mixed aneurysmal and obstructive coronary artery disease causing acute myocardial infarction in a young woman with Takayasu's arteritis. *Can J Cardiol* 2001;17:602-5.

154. Araszkievicz A, Prech M, Hrycaj P, Lesiak M, Grajek S, Cieslinski A. Acute myocardial infarction and rapid development of coronary aneurysms in a young woman--unusual presentation of Takayasu arteritis? *Can J Cardiol* 2007;23:61-3.
155. Hamdan A, Porter A, Georghiou GP et al. Unusual presentation of Takayasu arteritis. *Int J Cardiol* 2007;119:249-50.
156. Kittisupamongkol W. Myocardial infarction in Takayasu arteritis. *South Med J* 2009;102:1092.
157. Orea TA, Sanchez TG, Kuri AJ. [Cardiac damage in Takayasu's arteritis. Study in 125 patients]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1983;53:441-7.
158. Borg FA, Dasgupta B. Treatment and outcomes of large vessel arteritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009;23:325-37.
159. Fraga A, Mintz G, Valle L, Flores-Izquierdo G. Takayasu's arteritis: frequency of systemic manifestations (study of 22 patients) and favorable response to maintenance steroid therapy with adrenocorticosteroids (12 patients). *Arthritis Rheum* 1972;15:617-24.
160. Ishikawa K. Survival and morbidity after diagnosis of occlusive thromboaropathy (Takayasu's disease). *Am J Cardiol* 1981;47:1026-32.
161. Hoffman GS, Leavitt RY, Kerr GS, Rottem M, Sneller MC, Fauci AS. Treatment of glucocorticoid-resistant or relapsing Takayasu arteritis with methotrexate. *Arthritis Rheum* 1994;37:578-82.
162. Ozen S, Duzova A, Bakkaloglu A et al. Takayasu arteritis in children: preliminary experience with cyclophosphamide induction and corticosteroids followed by methotrexate. *J Pediatr* 2007;150:72-6.
163. Shinjo SK, Pereira RM, Tizziani VA, Radu AS, Levy-Neto M. Mycophenolate mofetil reduces disease activity and steroid dosage in Takayasu arteritis. *Clin Rheumatol* 2007;26:1871-5.
164. Buonomo PS, Bracaglia C, Campana A et al. Infliximab therapy in pediatric Takayasu's arteritis: report of two cases. *Rheumatol Int* 2009.
165. Maffei S, Di RM, Santoro S, Puccetti L, Pasqui AL. Refractory Takayasu arteritis successfully treated with infliximab. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009;13:63-5.
166. Liang GC, Nemickas R, Madayag M. Multiple percutaneous transluminal angioplasties and low dose pulse methotrexate for Takayasu's arteritis. *J Rheumatol* 1989;16:1370-3.

167. Murakami R, Korogi Y, Matsuno Y, Matsukawa T, Hirai T, Takahashi M. Percutaneous transluminal angioplasty for carotid artery stenosis in Takayasu arteritis: persistent benefit over 10 years. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1997;20:219-21.
168. Park JH, Han MC, Kim SH, Oh BH, Park YB, Seo JD. Takayasu arteritis: angiographic findings and results of angioplasty. *AJR Am J Roentgenol* 1989;153:1069-74.
169. Chapdelaine JP, Najarian KE, D'Agostino R, Morris CS. Stent placement in a carotid artery bypass graft in a patient with Takayasu arteritis. *J Vasc Interv Radiol* 1998;9:846-8.
170. Maskovic J, Jankovic S, Lusic I, Cambj-Sapunar L, Mimica Z, Bacic A. Subclavian artery stenosis caused by non-specific arteritis (Takayasu disease): treatment with Palmaz stent. *Eur J Radiol* 1999;31:193-6.
171. Wang YM, Mak GY, Lai KN, Lui SF. Treatment of Takayasu's aortitis with percutaneous transluminal angioplasty and wall stent--a case report. *Angiology* 1998;49:945-9.
172. Son JW, Koh KK, Dang Q, Choi IS, Shin EK. Recurrent restenosis following stent and rotational atherectomy of coronary artery stenosis in Takayasu's arteritis. *Int J Cardiol* 1998;65:295-300.
173. Tyagi S, Sharma VP, Arora R. Stenting of the aorta for recurrent, long stenosis due to Takayasu's arteritis in a child. *Pediatr Cardiol* 1999;20:215-7.
174. Baril DT, Carroccio A, Palchik E et al. Endovascular treatment of complicated aortic aneurysms in patients with underlying arteriopathies. *Ann Vasc Surg* 2006;20:464-71.
175. Tracci MC, Cherry KJ. Surgical treatment of great vessel occlusive disease. *Surg Clin North Am* 2009;89:821-36, viii.
176. NASU T. Pathology of pulseless disease. A systematic study and critical review of twenty-one autopsy cases reported in Japan. *Angiology* 1963;14:225-42.
177. Lupi HE, Contreras R, Espino VJ, Sanchez TG, Horwitz S. [Nonspecific arteritis in childhood. Clinical and anatomic-pathological observations]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1972;42:477-93.
178. Sen PK, Kinare SG, ENGINEER SD, PARULKAR GB. THE MIDDLE AORTIC SYNDROME. *Br Heart J* 1963;25:610-8.

179. Thiffault CA, Smith SR. Extrapulmonary tuberculosis with erythema nodosum and occlusive arterial disease. *Can Med Assoc J* 1966;95:273-6.
180. Rose AG, Sinclair-Smith CC. Takayasu's arteritis. A study of 16 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med* 1980;104:231-7.
181. Renteria VG, Contreras M. [Nonspecific aorto-arteritis. Anatomico-pathological study of 18 cases]. *Arch Inst Cardiol Mex* 1978;48:80-98.
182. Sharma BK, Jain S, Radotra BD. An autopsy study of Takayasu arteritis in India. *Int J Cardiol* 1998;66 Suppl 1:S85-S90.
183. Duzova A, Turkmen O, Cinar A, Cekirge S, Saatci U, Ozen S. Takayasu's arteritis and tuberculosis: a case report. *Clin Rheumatol* 2000;19:486-9.
184. Serratrice J, Benyamine A, Vidal V et al. [Simultaneous occurrence of diffuse Takayasu's arteritis and severe disseminated tuberculosis]. *Rev Med Interne* 2008;29:520-3.
185. Serratrice J, Benyamine A, Vidal V et al. [Simultaneous occurrence of diffuse Takayasu's arteritis and severe disseminated tuberculosis]. *Rev Med Interne* 2008;29:520-3.
186. Mwiipatayi BP, Jeffery PC, Beningfield SJ et al. Takayasu arteritis: clinical features and management: report of 272 cases. *ANZ J Surg* 2005;75:110-7.
187. Marquina-Castillo B, Garcia-Garcia L, Ponce-de-Leon A et al. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology* 2009;128:123-33.
188. Balasubramanian V, Wiegshaus EH, Taylor BT, Smith DW. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis* 1994;75:168-78.
189. MEDLAR EM. The pathogenesis of minimal pulmonary tuberculosis; a study of 1,225 necropsies in cases of sudden and unexpected death. *Am Rev Tuberc* 1948;58:583-611.
190. Ho RS, Fok JS, Harding GE, Smith DW. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. VII. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in primary lung lesions and in primary lesion-free lung tissue infected as a result of bacillemia. *J Infect Dis* 1978;138:237-41.
191. Canetti G, Sutherland I, Svandova E. Endogenous reactivation and exogenous reinfection: their relative importance with regard to the development of non-primary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1972;47:116-34.

192. Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:S231-S279.
193. Rustad TR, Sherrid AM, Minch KJ, Sherman DR. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol* 2009;11:1151-9.
194. Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol* 2004;110:2-12.
195. Tekin D, Kayaalti Z, Dalgic N et al. Polymorphism in the p2x7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis in Turkish children. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:779-82.
196. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003;3:578-90.
197. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2091-4.
198. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:711-20.
199. Mishra A, Singhal A, Chauhan DS et al. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *J Clin Microbiol* 2005;43:5670-8.

ANEXO

ANEXO 1
EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDOS FIJADOS EN PARAFINA
TÉCNICA DE NUCLEON
(ilustra Nucleon Genomic, GE Healthcare)

MATERIAL

Etanol 70% frío
Etanol absoluto frío
Xileno
Cloroformo
Reactivo B (asegurarse que esté completamente disuelto, puede ocuparse calor suave)

TÉCNICA

1. Tomar una sección de 20-30 micras de tejido y ponerla en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Cubrir el segmento en xileno. Incubar a 37°C por 20 minutos. Centrifugar a 1300 g (7500 r.p.m) por 5 minutos y remover el xileno.
3. Incubar en xileno a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugar a velocidad máxima por 5 minutos y remover todo el xileno.
4. Rehidratar el segmento por lavados consecutivos en etanol al 100%, etanol al 75%, etanol al 50%, etanol al 25% y finalmente en agua. Centrifugar a velocidad máxima de 1-3 minutos entre cada lavado (tener cuidado en los lavados con etanol al 25% y agua, ya que el material puede empezar a perderse al no formarse un buen pellet)
5. Remover el agua del pellet y añadir 350 µL de REACTIVO B.
6. Añadir 18 µL de la solución de proteinasa K + lisosima . Incubar a 55 °C toda la noche.

DESPROTEINIZACIÓN

7. A los 350 µL de lisado añadir 100 µL de la solución de perclorato de sodio. Mezclar invirtiendo el tubo al menos 7 veces.

EXTRACCIÓN DE DNA

8. Añadir 600 µL de cloroformo. Mezclar invirtiendo el tubo al menos 7 veces.
9. Añadir 150 µL de la resina Nucleon y sin mezclar las fases centrifugar a 350 g (2000 r.p.m) por 1 minuto.

PRECIPITACIÓN DEL DNA

10. Sin remover la capa de la resina de Nucleon (de color café) transferir la fase superior a un tubo limpio. (La fase de la resina no debe removerse para minimizar la contaminación de la interfase de las proteínas. Una fase blanca puede también estar asociada a la fase de la resina, esta fase debe de evitarse. Si se ha tomado un poco de la resina centrifugar 1 minuto a 1300 g (7500 r.p.m) para precipitar la resina y transferir el sobrenadante a un tubo limpio).

11. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión y dejar a -20°C por 1-2 horas para que precipite el DNA.

LAVADO DEL DNA

12. Centrifugar a máxima velocidad por 15 minutos el pellet de DNA. Descartar el sobrenadante.
13. Añadir 1 mL de etanol al 70% frío, mezclar varias veces por inversión. Recentrifugar y descartar el sobrenadante. Este paso puede repetirse si es necesario.
14. Secar al aire el pellet por 10 minutos, asegurándose de que todo el etanol ha sido eliminado.
15. Redisolver el DNA en un volumen apropiado de H_2O o en solución amortiguadora de TE (ej 100 μL).

GE Healthcare

illustra

Nucleon BACC Genomic DNA Extraction Kits

Product Booklet

Codes: RPN8501
RPN8502
RPN8509
RPN8512



ESTUDIO DE MORFOMETRIA

MORFOMETRIA

1. El porcentaje de biopsia será calculado como el número de tejido dañado /el número de tejido sano.
2. Los casos que resulten positivos serán evaluados morfométricamente a través de análisis de imagen utilizando un software procesador de imágenes image-Pro Plus (Image-Pro INC, Media Cybernetics). Se digitalizará un grupo de 100 células a 400 aumentos en un microscopio de campo claro (Olimpos Bx50) Objetivo 40X y oculares 10X) por medio de una cámara digital (CoolSnap-Plus) Los resultados obtenidos se expresarán en número de células positivas.
3. Tomando en cuenta la capacidad del Software para el reconocimiento de colores, se determinará como positiva una célula cuando ésta demuestre inmunorreacción café ocre, color que otorga la técnica de inmunoperoxidasa, por el método del complejo estreptaidina-biotina (ABC) cuando utiliza como revelador la diamnobencidina. Los resultados de estas tres mediciones serán categorizadas de la siguiente manera. + : 0 a 10 células positivas +: 11 a 50 células positivas +++: 51 a 70 células positivas ++++: 71 o más células positivas.
4. Para la evaluación de tejido afectado por fibrosis, los cortes serán teñidos con Tricromico de Masson. Diez campos no cruzados de corteza (640 x 477 mm por 10) por biopsia que serán analizados por microscopia de luz (modelo BX51, Olympus América, Melville, NY) y capturados por cámara de video digital (Cool Snap Pro, Media Cybernetics, Silver Spring MD)
5. Las fotos serán procesadas en una computadora y analizadas con image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics) and Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose C.A)
6. Para alcanzar capacidad de reconocimiento del color de este Software, áreas positivas en azul serán seleccionadas y cuantificadas en pixeles (unidades).
7. Por cada campo examinado el número de áreas positivas serán expresadas como una fracción del tejido (áreas azules positivas dividido entre el campo total). Finalmente
8. por cada biopsia, el número de medias fraccionales de áreas azules positivas será obtenido por promediar los valores obtenidos de los 10 campos examinados, con este mismo análisis.

Extracción del DNA de tejidos embebidos en parafina.

Técnica en el anexo III

El DNA se obtuvo utilizando un kit comercial (Illustra Nucleón Genomic, GE Healthcare) según las indicaciones del fabricante. Brevemente 20-30 micras de tejido en parafina contenidos en un tubo de 1.5 ml, se cubrió con xileno para desparafinar el tejido, se incubó 2 minutos. Se centrifugó y se removió el xileno. El tejido se re hidrató por lavados con etanol al 100%, al 75%, al 50% y por ultimo al 25%.

Después de estos lavados se agregó proteinasa K y se incubó toda la noche. Después del periodo de incubación se desproteinizó con perclorato de sodio. Se realizó la extracción con la resina Nucleón. Se precipitó el DNA con etanol absoluto, posteriormente se lava el DNA con etanol al 70% y se cuantificó.

La cuantificación se realizó y se obtuvo la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260/280 nm. El espectrofotómetro nos indicó la concentración del DNA (260nm), la pureza (260/280nm) de la cual decidimos que para el estudio tuviera valores de 1.7 a 1.8, el espectrómetro nos indicó concentración de la muestra de DNA la cual ya obtenida, se ajustó a una concentración final de 200 ng/μL para su posterior utilización. Se almacenaron las muestras a -70°C.

Amplificación del DNA

Protocolo de PCR: Amplificación de *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 gene

AMPLIFICACIÓN DE DNA DE 123pb del elemento de inserción (IS6110). Se utilizaron los oligonucleótidos IS6110 f (5' CCTGCG AGC GTA GGC GTC GG-3') y IS6110 r (CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3') brevemente, para una reacción de 25 μl, agregamos 10.7μl de H₂O doblemente destilada, 2.5μl de buffer 10x, 1.5μl de MgCl a 25 mM, 300 μM cada uno de los 4 trifosfatos desoxirribonucleótidos (disponibles en el kit del reactivo gen Amp PCR proporcionado por Applied Biosystem of Roche Company, USA), 0.125 μl de Taq polimerasa (Perkin Elmer), primer hacia delante (forward) y en reversa (reverse) a concentración final de 10pmol y 5 μL de muestra de DNA. El siguiente ciclo de amplificación fue usado para la PCR. Tres minutos a 95°C, 30 ciclos cada uno a: 94°C-30 segundos (desnaturalización), 63°C-30 segundos (alineación) y 72°C por un minuto (extensión), finalmente un ciclo de 72°C por diez minutos.

Protocolo de PCR Amplificación de *Mycobacterium bovis* y *tuberculosis hupB* gene PCR anidada.

El blanco de la prueba es la diferencia de 27pb en la región C Terminal del gen hupB en *M. tuberculosis* (Rv2986c) y *M. Bovis* (Mb3010c). Los iniciadores o primer usados para amplificar el gen hupB: Primers N (5'-GGAGGGTTGGGATGAACAAAGCAG-3') y S (5'GTATCCGTGTGTCTTGACCTATTTG-3'). La prueba anidada para la región C terminal del gen hupB primers: F (5'CCAAGAAGGCGA CAAAGG3') y R (5'-

GACAGCTTTCTTGGCGGG-3'). Cuatro μ l del producto amplificado de PCR con iniciadores (primers) N y S fueron usados como un templado de DNA para la PCR anidada. Cada reacción mixta (40 μ l) de la PCR anidada contuvo 1.25mM MgCl₂, 200 μ M de trifosfato deoxinucleotido, 0.5 μ M primers F y R, 10mM Tris-HCL (pH 8.8), 50mM KCL, 0.08% Nonidetp-40 y 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa. La mezcla de la reacción estuvo sujeta a desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos y 35 ciclos cada uno de 1min. a 94° C y alineación y extensión a 59°C y 72°C por 1 min., seguido de una extensión a 72°C por 10 minutos. Los productos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% y teñidos con bromuro de etidio y/o nitrato de plata. Los tamaños esperados para *M. tuberculosis* y *M. bovis* fueron de 116 y 89 pb, respectivamente. El límite de detección fue de 50 fg, el cual es equivalente a 5 bacilos tuberculosos. Un doble control fue incluido para discernir entre infección mixta de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.