



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

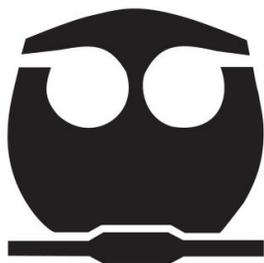
Asociación de los polimorfismos -762 y A1513C del gen *P2X7* en
pacientes con arteritis de Takayasu positivos para *Mycobacterium*
tuberculosis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGICA

PRESENTA:

MARÍA DEL MAR DE LA CRUZ PÉREZ



MEXICO D.F

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra**

VOCAL: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

SECRETARIO: **Profesor: Ricardo Gamboa Ávila**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño**

2° SUPLENTE: **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

ASESOR DEL TEMA: RICARDO GAMBOA ÁVILA _____

SUSTENTANTE (S): MARÍA DEL MAR DE LA CRUZ PÉREZ

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Marco teórico	4
Definición de la arteritis de Takayasu.....	4
Historia de la arteritis de Takayasu.....	4
Incidencia de la arteritis de Takayasu.....	5
Características clínicas de la arteritis de Takayasu.....	5
Clasificación de la arteritis de Takayasu.....	7
Diagnóstico de la arteritis de Takayasu.....	8
Etiología de la arteritis de Takayasu.....	10
Tuberculosis.....	11
Características clínicas de la tuberculosis.....	13
Diagnóstico de la tuberculosis.....	14
Patogénesis de la tuberculosis.....	15
La respuesta de la inmunidad innata a las micobacterias.....	17
Inmunidad adaptativa: interacciones de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el granuloma.....	18
Reactivación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Gen <i>P2X7</i>	20
Receptor <i>P2X7</i>	21
Agonistas del receptor <i>P2X7</i>	23
Antagonistas del receptor <i>P2X7</i>	23
Permeabilidad de la membrana a través del receptor <i>P2X7</i>	24
Muerte celular y el receptor <i>P2X7</i>	25
Polimorfismo 1513A/C.....	26
Polimorfismo -762T/C.....	26
Planteamiento del problema	27
Objetivo general y específico	28
Hipótesis	28
Diseño experimental	
Descripción.....	29
Definición de la población.....	29
Tamaño de la muestra.....	30
Metodología.....	30
Análisis estadístico.....	34
Resultados	34
Discusión	45

Conclusión	53
Referencias bibliográficas	54
Anexos	
Anexo 1: Técnica de obtención de ADN en muestras embebidas en parafina.....	59
Anexo 2: Procedimiento para ajustar la concentración de ADN.....	61
Anexo 3: Reactivos para la amplificación de ADN por PCR.....	62
Anexo 4: Gel de acrilamida al 8%, preparación y condiciones de la corrida de electroforesis.....	63
Anexo 5: Tinción de plata para gel de acrilamida al 8%.....	64

RESUMEN

La Arteritis de Takayasu es una enfermedad poco estudiada que presenta una mayor frecuencia en países como Japón, India y México. Su etiología es desconocida y se ha asociado a factores genéticos, enfermedades de tipo autoinmune y tuberculosis, entre otras.

La relación que se ha encontrado entre de la arteritis de Takayasu y la tuberculosis se basa en que en ambas enfermedades existe un proceso inflamatorio progresivo, por lo que se ha propuesto que a una infección por una micobacteria, que se mantiene en estado latente precede al proceso inflamatorio en la arteritis de Takayasu. Un posible vínculo entre estas enfermedades es el gen *P2X7* que codifica para un receptor (P2X7) de membrana expresado en diversas células entre ellas monocitos y macrófagos. El receptor P2X7 interviene en el proceso inflamatorio y la muerte de microorganismos intracelulares por medio de la apertura de canales dependientes de ATP, por donde fluye calcio, sodio y potasio, lo cual desencadena a su vez la cascada de caspasas y señales para el proceso de apoptosis. Los polimorfismos A1315C y -762T/C del gen *P2X7* se han asociado en algunas poblaciones a la pérdida de función del receptor P2X7.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la relación entre los polimorfismos del gen *P2X7* (1513 y -762) en tejido aórtico de pacientes positivos para la secuencia de inserción de *Mycobacterium tuberculosis IS6110* y con arteritis de Takayasu.

Se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con: arteritis de Takayasu (AT) (n=33), Tuberculosis (TB) (n=30); y el grupo control: con pacientes diagnosticados con aterosclerosis (At) (n=69) que sirvió como grupo control en el manejo de la muestra.

El ADN se obtuvo de biopsias de aorta conservadas en parafina. Se realizaron las genotipificaciones mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR (FRLP) para el polimorfismo -762T/C, mientras que para el polimorfismo A1513C se llevo a cabo por la técnica de PCR en tiempo real.

Los análisis estadísticos que se realizaron para los polimorfismos A1513C y -762 del gen *P2X7*, fueron los siguientes: a) comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas por grupo, utilizando todas las muestras, b) utilizando sólo las muestras que dieron positivo al gen *IS6110* específico para *M. tuberculosis*, las frecuencias genotípicas fueron comparadas por grupo y analizadas con respecto al grupo control y c) finalmente empleando sólo muestras positivas para la secuencia de inserción *IS6110* se analizó el tipo de tuberculosis por genotipo y grupo. Los resultados que se consideraron estadísticamente significativos fueron aquellos con valor de $p \leq 0.05$.

Los resultados obtenidos de los análisis estadísticos siguiendo el orden del párrafo anterior fueron:

- a) Para el SNP 1513A>C, la comparación del genotipo AA vs AC fue significativa para todos los grupos: TB y aterosclerosis. En la evaluación del SNP -762 se obtuvo que el genotipo TT vs TC tuvo significancia en los grupos de AT y aterosclerosis.
- b) En el análisis con muestras +*IS6110*, el genotipo AA del polimorfismo A1513C tuvo diferencias significativas en el grupo control y en TB. La evaluación del genotipo AA del SNP 1513A>C para los grupos de AT y TB respecto al grupo control fue significativa. También el genotipo TT del SNP -762 presentó significancia en la comparación de los grupos AT y TB con el grupo control.
- c) Se observó una significancia para el polimorfismo A1513C al comparar el total de muestras con TB pulmonar con genotipo AA (29.3%) contra el total de Tb pulmonar con genotipos AC+CC (12.1%).

En la población estudiada el genotipo AA del polimorfismo 1513 en las enfermedades de AT y TB representó riesgo para el desarrollo de las enfermedades mencionadas, y el polimorfismo -762 el genotipo TT representó riesgo a padecer arteritis de Takayasu y tuberculosis.

INTRODUCCIÓN

La arteritis de Takayasu (AT) es una enfermedad que afecta a las grandes arterias, como la aorta y sus ramas con un proceso inflamatorio crónico que desencadena complicaciones como aneurismas y la muerte. Este padecimiento es difícil de diagnosticar en su inicio. La etiología de ésta enfermedad se desconoce, aunque se ha asociado a cuestiones genéticas, enfermedades autoinmunes y a tuberculosis (TB).

La AT y la tuberculosis comparten un proceso inflamatorio como parte de la respuesta inmune. La AT en su primera etapa se caracteriza por el desarrollo de granulomas al igual que la tuberculosis, los granulomas recién formados están integrados por fagocitos mononucleares inmaduros rodeados por las células efectoras linfocíticas incluyendo células T; CD4+ y CD8+. Al fallar esta respuesta inmune en el caso de la tuberculosis ocurre la diseminación de la micobacteria y en la AT ocurre un proceso inflamatorio vascular en la capa adventicia que se caracteriza por infiltración de células B y T, habiendo casos de formación de nódulos con células B en el centro, y células T y células detriticas hacia la periferia.

El receptor P2X7 es expresado en diferentes células entre las que destacan macrófagos, este receptor es activado por ATP provocando la apertura de canales que permiten la entrada de calcio y como consecuencia promueve la apoptosis y con ello la liberación de la interleucina madura (IL-1b), además de promover la activación de las metaloproteasas de la membrana, generando la expresión de I-selectina (CD62L), tanto en linfocitos como en monocitos, activando la cascada de caspasas. Este receptor es codificado por el gen *P2X7*, el cual presenta varios polimorfismos de los cuales, se ha reportado en diversos estudios que los polimorfismos 1513A/C y el -762T/C pueden estar implicados en la pérdida de la función del receptor.

Existen estudios que muestran la asociación de los polimorfismos antes mencionados con la tuberculosis, en donde los alelos mutantes de ambos polimorfismos pueden estar implicados con la susceptibilidad a esta enfermedad.

Como ya se menciono anteriormente los polimorfismos 1513A/C y el -762T/C están relacionados con TB a su vez la tuberculosis se ha asociado a la tuberculosis, por lo tanto conocer la asociación de estos polimorfismos con la arteritis de Takayasu nos pueden dar un indicio para conocer la etiología de la misma.

MARCO TEORÍCO

Definición de Arteritis de Takayasu

La Arteritis de Takayasu (AT) fue definida por el American Collage of Rheumatology (ACR) como una vasculopatía crónica inflamatoria idiopática de las grandes arterias elásticas, cuyo resultado son cambios oclusivos o ectásicos, principalmente en la aorta y sus ramas inmediatas (tronco braquicefálico, las arterias carótidas, subclavias, vertebrales y renales), así como también las arterias coronarias y pulmonares.¹

Historia de la enfermedad de Takayasu

La primera descripción de la enfermedad de Takayasu fue hecha en 1830 por Rokushu Yamamoto. Describió a un hombre de 45 años con fiebre, ausencia de pulso, pérdida de peso y falta de aire, que murió en su 11º año de seguimiento. En 1905, Mikito Takayasu, profesor de oftalmología, describe a una mujer de 21 años con peculiares malformaciones arteriovenosas. A pesar de que Takayasu no indica que otras arterias estaban involucradas, en el debate que siguió, dos oftalmólogos, Onishi y Kagoshima, describen hallazgos oculares similares, junto con la ausencia del pulso radial².

Algunos médicos, por lo tanto, insisten en denominar este padecimiento como "enfermedad de Takayasu-Onishi". Poco después, varios casos fueron reportados en Japón, incluyendo un informe en 1939 por Yasuzo Shinmi que utilizó por primera vez el término "arteritis de Takayasu" al referirse al caso de una paciente de 28 años de edad, que se queja de delirio y es hospitalizada en el Departamento de Psiquiatría de la Universidad de Tokio el 27 de Octubre de 1939. El examen médico de esta paciente, cuenta y describe que los pulsos radiales de la arteria braquial y la arteria carótida no eran palpables. Después de una semana de hospitalización falleció. El informe de la autopsia, señaló

que el paciente había sufrido de panarteritis de aorta, carótida interna y externa, las arterias subclavia y axilar. La paciente murió de cerebromalacia y congestión pulmonar³.

Más tarde, Kunio Oohta vuelve a examinar este caso e informó a la Sociedad Patológica de Japón en 1940, haciendo hincapié en que los cambios inflamatorios no sólo se limitan a la capa media, sino también en la íntima y la adventicia de las arterias, lo que equivale a panarteritis. Oohta también señaló por primera vez que las arterias pulmonares estaban involucradas en la arteritis de Takayasu³.

En 1948 se describen las características clínicas: la falta de pulso, anastomosis coronaria en los vasos de la retina, que se acentúa en el seno carotideo como reflejo característico de esta condición mórbida. También se difunde un artículo sobre la enfermedad de Takayasu en países occidentales a través del *American Heart Journal* escrito por Caccamize y Whiteman⁴. En 1951, las características clínicas de la enfermedad de Takayasu se resumieron en un diario Inglés bajo el nombre de enfermedad sin pulso⁵.

En 1975, la investigación del Comité del Departamento de Salud y Bienestar de Japón propuso el uso de "arteritis de Takayasu" en memoria del autor del primer reporte acerca del padecimiento, Mikito Takayasu³.

Incidencia de la Arteritis de Takayasu

La arteritis de Takayasu tiene una incidencia de 1.2-2.6 millones por año⁶. La Arteritis de Takayasu es una vasculopatía rara que afecta principalmente a mujeres jóvenes, que se encuentran entre los 20 y 30 años de edad⁵, teniendo una relación mujer: hombre de 9:1⁷; siendo la tercera vasculitis más frecuente en la infancia después de la purpura de Henoch Schonlein y la enfermedad de Kawasaki⁸. Es más frecuente en Oriente principalmente en Japón, sureste de Asia, India y México⁵.

Su incidencia no es tan frecuente en Europa, Estados Unidos y Canadá. En África es bastante rara, excepto en Sudáfrica. En India y en Sudáfrica la TA compromete en forma más frecuente la aorta abdominal; por ello en estos

casos hay hipertensión arterial, isquemia y se describe la forma aneurismática. En Latinoamérica, en México, Brasil y Colombia es la vasculitis más frecuente¹⁰, (ver tabla 1).

País	México	Brasil	Chile	C. Rica	Argentina	Venezuela	Colombia
N° de casos	413	83	15	4	1	4	114

Tabla 1. Comparación de los casos de TA en algunos países de Latinoamérica, (recopilación de casos reportados en artículos hasta el año 2007) tomado de Ochoa Carlos (2009)¹⁰.

Características Clínicas de la Arteritis de Takayasu (AT)

La AT es una enfermedad inflamatoria granulomatosa segmentaria y parcial de las tres capas de la aorta y sus ramas principales⁶, que provoca estenosis en las arterias medianas y de gran tamaño, debido a que afecta generalmente el arco aórtico y sus ramas. Esta enfermedad está caracterizada por fibroproliferación de la íntima de la aorta, grandes vasos, las arterias pulmonares y las arterias renales que lleva a la estenosis segmentaria, oclusión, dilatación y aneurisma en los vasos. Un término alternativo, aortoarteritis idiopática o no específica se ha utilizado para describir el espectro de las anomalías vasculares asociadas con esta condición⁶.

Se describen dos fases o etapas de la AT. Una temprana, que se caracteriza por síntomas sistémicos inflamatorios inespecíficos (fiebre, sudoración nocturna, artralgias, mialgias, pérdida de peso y anemia), la patología en la aorta y ramas durante esta primera etapa consiste en cambios granulomatosos en la media y la adventicia.

La segunda fase está dada por un proceso inflamatorio vascular activo localizado, caracterizado por dolor en el área afectada y aparición de signos y síntomas de insuficiencia circulatoria en la región afectada. El proceso inflamatorio se caracteriza en la capa adventicia con infiltración de células B y T, habiendo casos de formación nódulos con células B en el centro, células T y células detríticas en la periferia⁵, además se observan cambios en la capa media con células de Langerhans y necrosis central de fibras de células de músculo liso⁶. Este proceso de la enfermedad continúa, a tasas variables, a

una etapa esclerótica, con hiperplasia de la capa íntima, degeneración de la capa media y fibrosis en la capa adventicia, que puede comprometer la luz del vaso. La aorta y arterias involucradas desarrollan estrechamiento segmentario, que da lugar a manifestaciones clínicas de isquemia.

Cuando se desarrolla la estenosis aparecen los hallazgos más característicos: disminución o ausencia de pulsos, soplos, hipertensión arterial, síntomas neurológicos, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar, etcétera.

El compromiso vascular suele ser múltiple y las arterias afectadas más frecuentemente son las subclavias, las carótidas, las vertebrales y las renales. El compromiso cardíaco por estenosis u oclusión de la circulación coronaria se presenta en 9% a 10% de los pacientes como infarto de miocardio o muerte súbita¹.

Clasificación de la Arteritis de Takayasu

Existen varias clasificaciones de esta enfermedad, en este trabajo se hace referencia a la presentada en la conferencia de la arteritis de Takayasu de 1994. Esta clasificación está basada en la región anatómica en la que se presenta el daño y se distinguen cinco tipos diferentes (ver figura 1 y tabla 2). Este sistema es útil debido a que hace una comparación de las características del paciente de acuerdo a los vasos involucrados y ayuda a planear la cirugía⁵.

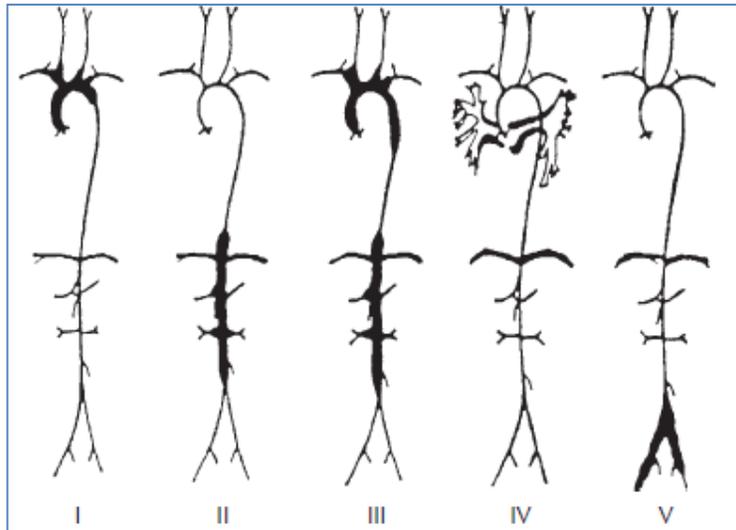


Figura 1. Clasificación angiográfica de la arteritis de Takayasu. Se muestra la localización de la lesión y el tipo al que pertenece. Tomado de Hahn Deirdré, et al. (1998)¹¹.

Tipo	Vaso involucrado
I	Ramas del arco aórtico
IIa	Aorta ascendente, arco aórtico y sus ramas
IIb	Aorta ascendente, arco aórtico y sus ramas, aorta torácica descendente.
III	Aorta torácica descendente, aorta abdominal y/o arterias renales.
IV	Aorta abdominal y/o arterias renales
V	Características combinadas de los tipos IIb y IV.
*Cuando se involucran las arterias coronarias o pulmonar deben ser designadas como C (+) o P (-).	

Tabla 2. Clasificación angiográfica de la arteritis de Takayasu⁵.

Diagnóstico de la arteritis de Takayasu

La arteritis de Takayasu es un padecimiento crónico recurrente y puede cursar de forma asintomática en un 10% de los casos. El Colegio Americano de Reumatología definió los criterios diagnósticos para la arteritis de Takayasu en

1990¹, pero fueron insuficientes para diagnosticar con precisión, por lo que fueron modificados en el año de 1996 por Sharma y colaboradores. El diagnóstico de la AT bajo estos criterios se hace basándose en signos y síntomas clínicos, datos de laboratorio y hallazgos angiográficos, (ver tabla 3). Para poder diagnosticar la arteritis de Takayasu se requiere la presencia de: a) 2 criterios mayores; b) 1 criterio mayor y 2 menores, y c) 4 criterios menores. A pesar de esto, la frecuente inespecificidad analítica hace que el diagnóstico final dependa en gran medida de los estudios de imagen¹² (ver tabla 3).

Criterios diagnósticos de Ishikawa modificados por Sharma et al (1996)	
Criterios mayores (de más de un mes de duración)	Criterios menores
Claudicación de las extremidades	Elevación de la velocidad de sedimentación globular mayor 20 mm/h.
ausencia de pulsos	Carotidina (sensibilidad en arteria carótida)
palpitaciones	Hipertensión arterial
amaurosis fugaz	Regurgitación aórtica
dolor en cuello	
fiebre	
visión borrosa	
síncopes	
disnea	

Tabla 3. Criterios diagnósticos de la arteritis de Takayasu realizados por Ishikawa modificados por Sharma et al (1996)¹².

La arteriografía es indispensable para el diagnóstico y seguimiento de la AT. Sin embargo, su capacidad está limitada a la detección de cambios en el diámetro luminal típicos de la etapa tardía de la enfermedad. Con este método no se ponen de manifiesto la presencia de inflamación vascular y el engrosamiento parietal, característicos de etapas más tempranas. El reconocimiento en la fase pre-estenótica permitiría iniciar el tratamiento en un estadio potencialmente reversible.

Últimamente se ha utilizado la tomografía con emisión de positrones (PET) que permite la identificación temprana de todos los vasos afectados, los cuales

muestran, debido a la actividad inflamatoria, un aumento de la captación de la F18-desoxiglucosa. Es posible de este modo el diagnóstico precoz de la enfermedad y el seguimiento de la respuesta terapéutica dado que la captación disminuye con la remisión.

No existe el diagnóstico de laboratorio debido a la falta de marcadores séricos específicos para la enfermedad de AT en la actualidad, tampoco existe ninguna prueba serológica conocida capaz de suplantar el análisis histopatológico vascular en la determinación de activos debido a la inflamación. En algunos estudios de laboratorio, los resultados podrían variar por ejemplo: la concentración de Proteína C reactiva podría presentar valores elevados y la velocidad de sedimentación globular puede ser acelerada, pero su correlación con la actividad de la enfermedad no es clara¹³. El recuento sanguíneo completo muestra anemia normocítica/normocrómica, en el 50% de los pacientes. El factor reumatoide es elevado en el 15% de los pacientes, algunos pacientes muestran niveles elevados de transaminasas, hipoalbuminemia y hipergammaglobulinemia⁶.

Etiología de la arteritis de Takayasu

La causa de la enfermedad de Takayasu es desconocida; pero se ha asociado con diversos factores como anormalidades inmunológicas inespecíficas tales como hipergammaglobulinemia o autoanticuerpos que son frecuentemente encontrados en pacientes con AT. También han sido descritas asociaciones ocasionales con otras enfermedades autoinmunes⁷.

Recientemente, se encontró una correlación de la inflamación con los niveles séricos de citocinas como la interleucina (IL) - 6 y RANTES (regulador en la activación, de células T normales expresadas y secretadas) con la actividad de la enfermedad de Takayasu¹⁴.

Una predisposición genética ha sido asociada a AT basada en su distribución étnica y geográfica. Los intentos para relacionarlos con genes HLA (del inglés *Human Leucocyte Antigen*) clase II han conducido a asociaciones débiles y variables nada concluyentes⁷. Mientras que para HLA de clase I se ha

encontrado un aumento en la expresión en el tejido de aorta con arteritis de Takayasu en comparación con la expresión en el tejido de aorta normal.

Esta relación con la arteritis de Takayasu con HLA-I se basa en que las células T reconocen los antígenos por sus receptores en asociación con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés: Major Histocompatible Complex). Por otra parte, interacciones célula-célula en la respuesta inmune se cree que son mediadas por moléculas de adhesión expresadas tanto en células inmunes y células diana.

También se ha asociado este padecimiento a la liberación de perforina, proteína liberada por parte de células NK que se ha encontrado aumentada en estudios histopatológicos de aorta con AT¹³. Por otra parte se sospecha de la asociación con la proteína de choque térmico de 65 kDa con la enfermedad de Takayasu.

Existen estudios donde se reporta que se le encuentra asociada a la infección tuberculosa, esta asociación ha sido documentada en México por Lupi, Sánchez, Robles y Reyes¹³. Su asociación con la tuberculosis (TB) fue descrita por primera vez hace unos 50 años, basado en la presencia de células gigantes tipo Langerhans y granulomas similares a los encontrados en lesiones por tuberculosis. Esta asociación es común en zonas endémicas de TB. Ambas enfermedades presentan lesiones similares crónicas inflamatorias y en ocasiones también granulomas provisionales en las paredes arteriales¹⁵.

Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad crónica que afecta principalmente los pulmones pero puede afectar a otras partes del cuerpo como los nódulos linfáticos, huesos, articulaciones, riñones y también puede causar meningitis. Es causada por un conjunto bacteriano *Mycobacterium*, género perteneciente a la familia Mycobacteriaceae que se integra por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* y *M. microti*, siendo la primera de ellas el agente causal más común, las demás también pueden causar tuberculosis, pero estas especies no suelen hacerlo en individuos sanos.

Mycobacterium tuberculosis fue descubierta por Robert Koch que la aisló en 1882, por ello también MTB es conocido como el bacilo de Koch. Es una bacteria ácido-alcohol-resistente, aerobia estricta, su crecimiento está subordinado por la presencia de oxígeno. Es muy resistente al frío, la congelación y la desecación y por el contrario muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta. Su replicación es muy lenta (se divide en periodos de 16 a 20 hrs.) y ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años.

El reservorio natural del *M. tuberculosis* es el hombre, tanto el sano infectado como el enfermo. Se estima que un tercio de la población mundial ha tenido contacto con esta bacteria, y que sólo una baja proporción de las personas infectadas desarrollan la enfermedad¹⁶.

Existen registros de la tuberculosis en China de hace 2300 años de antigüedad, en India hace 3300 años y el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Mycobacterium tuberculosis* se ha encontrado en momias egipcias que vivieron hace ya 5400 años. A pesar de que es una enfermedad muy antigua siguen habiendo casos en la actualidad, esto se debe a diferentes causas: la resistencia desarrollada por MTB a diversos antimicrobianos, la propagación de la infección por personas infectadas que no desarrollan la enfermedad y que migran a otros lugares. Se estima que para el año 2050 habrá 5 millones de muertes por tuberculosis a nivel mundial¹⁷.

En México la información preliminar de la Plataforma Única de Tuberculosis del año 2007 señala que se registró una tasa de 16.3 por cada 100 mil habitantes de TB en todas sus formas (17 143 casos nuevos). Del total de casos notificados en 2007, la forma más frecuente fue la TB pulmonar, al registrarse una tasa de 13.5 (14 422 casos nuevos)¹⁸. Ver figura 2.

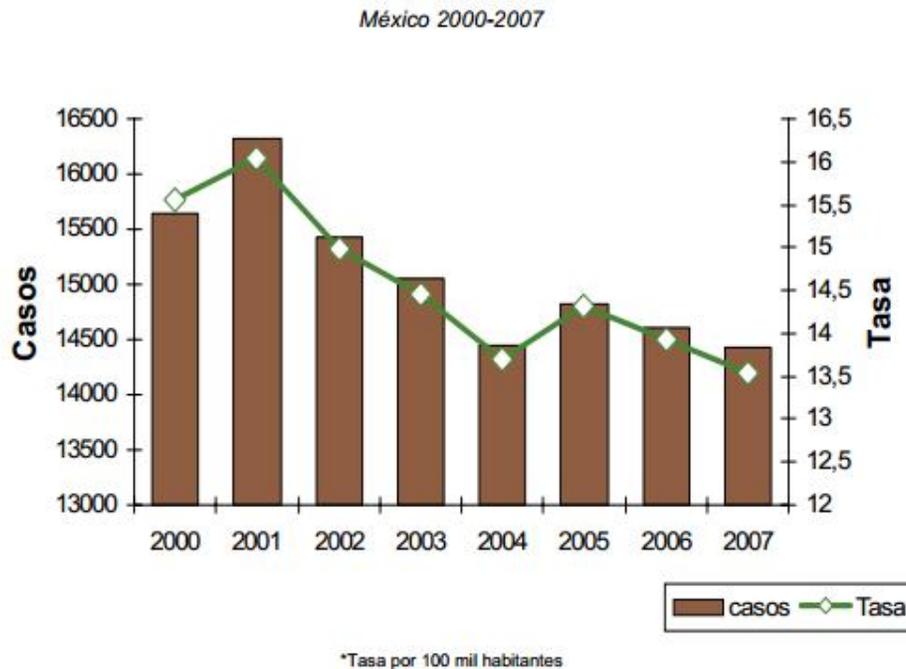


Figura 2. Gráfica incidencia de TB pulmonar en los años 2000-2007 en México. Tomado de Epidemiología (SINAVE; 2008)¹⁸.

Características clínicas de la Tuberculosis.

Comúnmente los síntomas de la tuberculosis se dividen en dos: TB primaria y reactivación de la TB. Los síntomas que caracteriza a la tuberculosis primaria son: tos, fiebre, pérdida de apetito, también puede haber silbidos debido a la compresión bronquial por los ganglios linfáticos inflamados y signos de neumonía. Las complicaciones inmediatas incluyen la bronconeumonía, derrame pleural y enfermedad diseminada. Las complicaciones intermedias incluyen diversas formas de enfermedades pulmonares y las complicaciones tardías son las bronquiectasias.

Sin embargo, la mayoría de las infecciones primarias pasan desapercibidas y la infección permanece latente por muchos años, la reactivación de la enfermedad primaria se da en la vejez o en un estado de salud inmunosuprimido o inmunocomprometido apareciendo como una tos crónica a veces con hemoptisis (presencia de sangre en el esputo), malestar general y pérdida de peso. La fiebre y sudores nocturnos son frecuentes.

Diagnóstico de Tuberculosis

Generalmente la forma inactiva de tuberculosis pulmonar, que es la forma más común es asintomática en un inicio, pero cuando aumenta el grado de severidad y su extensión, aparecen algunos síntomas como tos, expectoración, disnea y con menos frecuencia, hemoptisis. La hemoptisis puede ocurrir ante una tuberculosis activa o inactiva y lo más común es la presencia de estrías de sangre en la expectoración. La hemoptisis masiva es poco común.

Cuando hay sospecha de que pueda existir un caso positivo de tuberculosis, el diagnóstico con la prueba bacteriológica es la primera opción. La baciloscopia se hace en serie de tres, las muestras a analizar pueden ser de origen respiratorio (esputo normal o inducido, lavado bronquial y broncoalveolar, biopsia, s endoscópicas o quirúrgicas,) o no respiratorias (orina, LCR, sangre y médula ósea en inmunodeprimidos, punciones aspirativas y biopsias.

La confirmación de tuberculosis se hace mediante radiografía de tórax, aunque no existe un patrón radiológico característico los hallazgos más frecuentes son: cavernas en lóbulos superiores, condensaciones pulmonares [neumónicas], derrame pleural, imagen miliar o de mijo, ensanchamiento mediastinal y cavernas en lóbulos inferiores (frecuentes en inmunosuprimidos) ¹⁹.

Un diagnóstico positivo se establece con al menos una baciloscopia positiva en una serie de tres; sin embargo, un resultado negativo, no excluye el diagnóstico de tuberculosis ¹⁹, ver Figura 3.

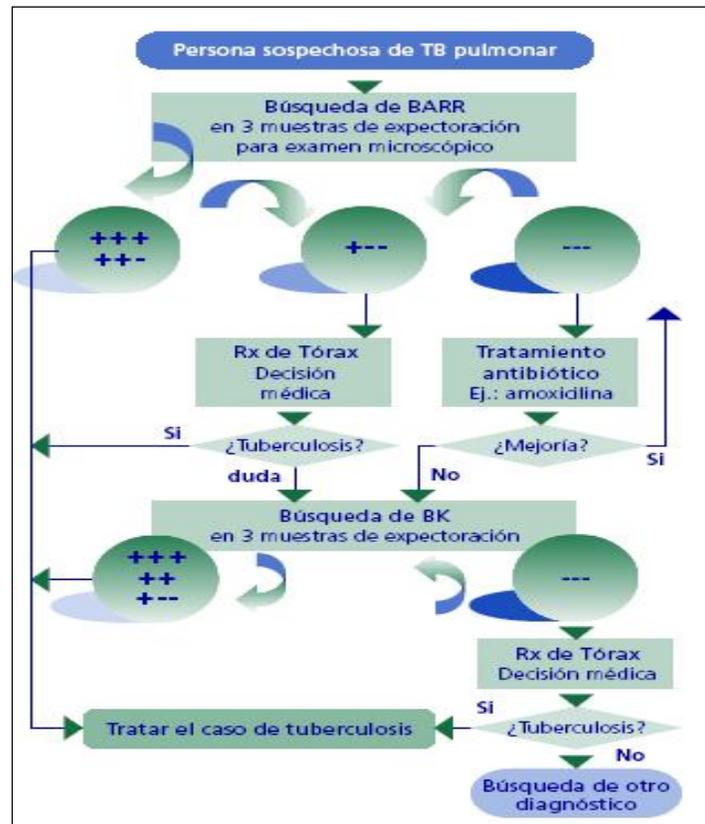


Figura 3. Mapa conceptual que muestra el proceso para el diagnóstico por medio de baciloscopia de Tuberculosis. Tomado de García (2006)¹⁹.

Patogénesis de *M. tuberculosis*: etapas de la infección

La infección por *M. tuberculosis* se puede dividir en tres etapas separadas entre sí, ver figura 4. En la primera etapa, individuos se infectan por vía aérea, las personas infectantes eliminan bacilos a partir de aerosoles (tos, expectoración) y la capacidad infectante depende del número de bacilos inhalados y de la susceptibilidad del huésped. Dentro de los pulmones, lugar que infecta principalmente *MTB*, reside en células fagocíticas como los macrófagos alveolares y células dendríticas, o alternativamente, en monocitos en sangre periférica donde se reproduce muy lentamente (lo cual es característico de las micobacterias), aunque se piensa generalmente que los macrófagos proporcionan una barrera efectiva contra la infección inicial por *M. tuberculosis*, ésta ha desarrollado numerosas estrategias que le permiten sobrevivir y establecer su residencia inicial en las células. Estas incluyen mecanismos para reducir la acidificación dentro del fagosoma, modificar el

tráfico de éste, y alterar la asociación de varias proteínas de membrana del organelo¹⁶.

El curso de infección durante la segunda etapa es principalmente dictado por la respuesta inmune adquirida del hospedero. Es en esta etapa de la infección en donde el organismo del individuo produce suficientes linfocitos sensibilizados, entonces los bacilos de TB son rodeados por cuatro capas celulares [células epitelioides, células gigantes, linfocitos (sensibilizados) y fibroblastos], para impedir que continúen su multiplicación, es decir, la formación del granuloma. A esta respuesta del hospedero se le conoce como primoinfección o lesión granulomatosa y representa el principal mecanismo del organismo para “controlar a las micobacterias” (ante su casi imposibilidad de erradicarlas)²⁰.

La tercera y etapa final de la infección se caracteriza por la reactivación del bacilo de la tuberculosis en estado latente, y el inicio posterior de la infección aguda secundaria en el huésped¹⁶.

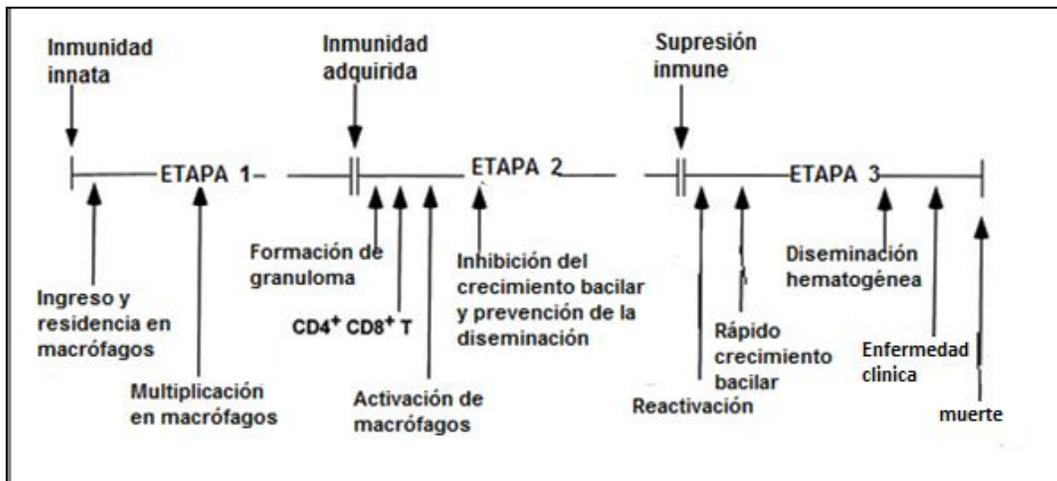


Figura 4. Muestra las etapas de la infección por *M. tuberculosis* y los eventos representativos de cada una de ellas¹⁶.

La respuesta de la Inmunidad Innata a las micobacterias

La primera etapa (fig. 5) comienza con la entrada del microorganismo al cuerpo y activar la respuesta inmune innata, las primeras células que intervienen son los macrófagos y las células detriticas que contienen receptores de reconocimiento a patógenos (PRR) que se unen a moléculas conservadas en bacterias denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Una vez que los macrófagos han reconocido algún PAMP, proceden a fagocitarlo.

La fagocitosis tiene diferentes variantes pero la que más se ha observado en las infecciones con *M. tuberculosis* es la fagocitosis convencional que consiste en que la membrana celular del macrófago o célula detritica, en este caso, se torna en forma de dos dedos simétricos o pseudópodos que rodean el organismo, resultando en una vacuola llamada fagosoma o endosoma. La mayoría de los fagosomas se fusionan con los lisosomas dando lugar a un fagolisosoma.

La fusión fagolisosomal se regula por la interacción de moléculas Rab 7 y proteínas lisosomales, este proceso es importante no sólo para matar, sino también para la eliminación de los organismos muertos y la generación de fragmentos proteolíticos del patógeno para el reconocimiento de las células T. Sin embargo, MTB evita la acidificación y previene la fusión fagolisosomal, debido a que las micobacterias tienen un factor que desactiva a Rab7.

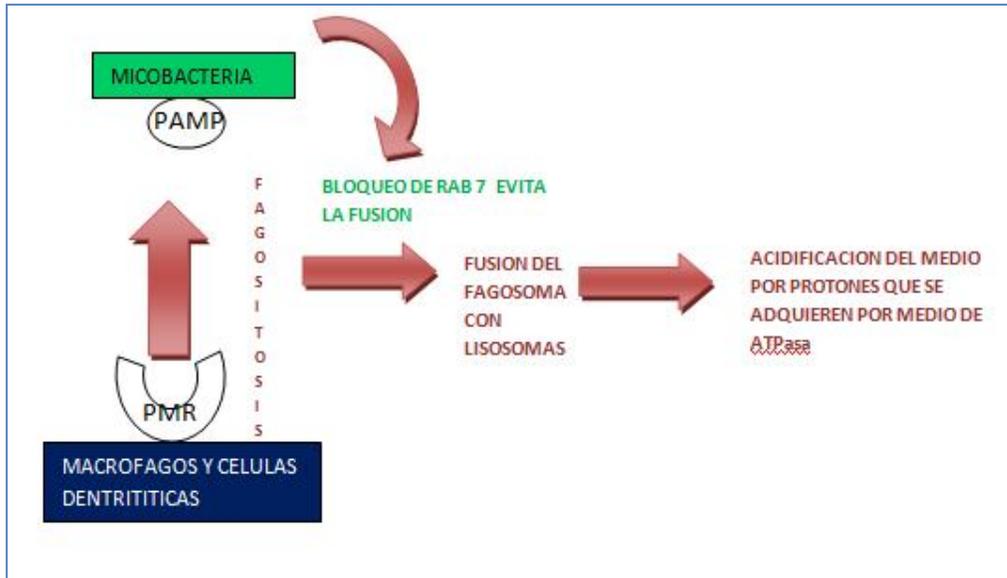


Figura 5. Esquema representativo de la respuesta inmune innata en presencia de micobacterias.

Inmunidad adaptativa: Interacciones de *Mycobacterium tuberculosis* en el granuloma

El principal mecanismo utilizado por el hospedero para el control del crecimiento de *M. tuberculosis* durante la infección persistente, y el límite del crecimiento bacilar y difusión a los sitios adicionales de infección, es la formación de granulomas. Los granulomas son agregados organizados de las células inmunes que rodean a los focos de tejidos infectados¹⁶. Los granulomas recién formados están integrados por fagocitos mononucleares inmaduros rodeados por las células efectoras linfocítica incluyendo células T; CD4 + y CD8 +.

El modelo común de un granuloma tuberculoso humano describe un área de necrosis central, que proporciona la fuente nutricional para micobacterias persistentes, rodeado por un muro denso de leucocitos para la prevención de la propagación de micobacterias. La infiltración de leucocitos también contribuye al deterioro masivo de los tejidos afectados. Cuanto más se agranda el granuloma, la necrosis se expande a expensas de las capas de células que lo rodean²¹.

Dentro de los granulomas, es generalmente como se cree que *M. tuberculosis* debe adaptarse a un gran ambiente dinámico. En primer lugar, a gran parte de los alrededores tejido calcificado o necrótico. En segundo lugar, el interior del granuloma se piensa que es carente o contienen bajos niveles de oxígeno. En tercer lugar, se cree que los granulomas contienen altas concentraciones de dióxido de carbono, y poseen mayores niveles de ácidos orgánicos alifáticos y enzimas hidrolíticas. Por último, la activación de los macrófagos y de otras células efectoras inmunes que rodean el granuloma liberando numerosos compuestos antimicrobianos¹⁶ (figura 6).

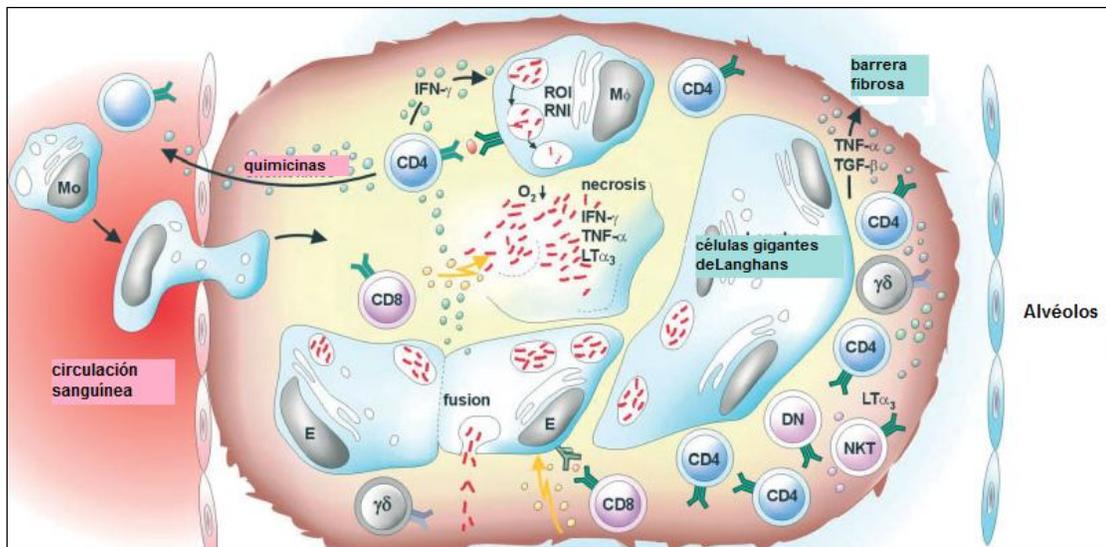


Figura 6. Esquema en donde se muestran las estructuras que forman los granulomas y la respuesta inmune. Macrófagos (Mo), células epiteloideas (E), en el centro del granuloma se encuentran las micobacterias, entonces se activan las células epiteloideas para presentar antígenos a las células T y producir una variedad de citocinas y quimiocinas, o para matar las células infectadas y micobacterias intracelulares. Las quimiocinas reclutan células adicionales de la circulación sanguínea al sitio de infección primaria. IFN- γ activa los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos para matar las bacterias intracelulares a través de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) o intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI). Células T CD4 + y Mo producen TNF- α y la linfotóxina- α 3 (LT α 3), que se requiere para la formación de la pared que rodea el granuloma. En el centro del granuloma, el bajo nivel de oxígeno forma un ambiente hostil para micobacterias. Las células T CD8 + liberan granulinsina y perforina a causa de la detección de antígenos extraños a través del TCR. Tomado de Ulrichs Timo y Kaufmann Stefan (2006)²⁰.

Reactivación de *Mycobacterium tuberculosis*

Los mecanismos de los que se vale *M. tuberculosis* para entrar en latencia se desarrollan después de la respuesta inmune adaptativa, esto es cuando la concentración de oxígeno disuelto disminuye hasta el 1% presentándose una interrupción abrupta en la síntesis de ADN y de ARN. También los bacilos reducen la síntesis de proteínas, se vuelven resistentes a varios fármacos incluyendo isoniacida y rifampicina, e inducen la expresión de numerosos productos de genes que (i) permiten la utilización de fuentes alternas de energía (como el ciclo del citrato para permitir el metabolismo de los lípidos abundantes en el centro necrótico de granulomas), (ii) estabilizan y protegen productos celulares esenciales y (iii) el sitio iniciador que regula los genes mediadores de la respuesta de adaptación¹⁶.

Cuando las micobacterias encuentran un ambiente propicio para su desarrollo, es decir, que el sujeto infectado está inmunosuprimido, entonces se dará la reactivación de las micobacterias, se reproducirán nuevamente y se diseminarán.

Gen *P2X7*

El gen *P2X7* pertenece a la familia de genes *P2XR*, que está conformada por siete miembros (*P2X1-7*). Este gen ha sido encontrado en mamíferos y en ovíparos, pero no en invertebrados²².

El gen *P2X7* tiene un tamaño de 53 kb con 13 exones y ha sido asignado a la región cromosómica 12q24²³, que codifica para un polipéptido de 595 aminoácidos de largo, (receptor *P2X7*), este receptor se expresa en la membrana celular y se activa principalmente por adenosin -5'-trifosfato (ATP)²⁹, en diversos tipos de células desde las neuronas, macrófagos, células dendríticas, los fibroblastos, linfocitos y células endoteliales²⁴.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son variaciones de una secuencia de ADN que ocurren cuando un solo nucleótido en la secuencia es diferente de la normal en al menos 1% de la de la población. Cuando los SNPs ocurren dentro de un gen, crean diferentes variantes, o alelos, del gen²⁵. El

gen *P2X7* es altamente polimórfico y hay 32 variantes, dependiendo del aminoácido alterado.

Receptor P2X7

El receptor P2X7 pertenece a la familia de receptores P2X (P2XR) dependientes de ATP (la activación del P2X7 requiere una concentración casi milimolar de ATP²⁶), que funciona como canales permeables y no selectivos a iones como al Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. Las respuestas en los tejidos se basa en su capacidad de actuar directamente sobre los conductos para la entrada de Ca²⁺ o indirectamente como activadores de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje²⁵.

Los receptores P2X son canales de triméricos compuestos por subunidades proteicas codificadas por siete genes diferentes P2XR (nombrados P2X1 hasta P2X7, según el orden de clonación) expresados en mamíferos y algunos vertebrados.

Los receptores P2XR comparten una estructura similar que comprende dos segmentos transmembranales, un bucle extracelular que contiene 10 cisteínas esparcidas homogéneamente, residuos conservados de lisina y de glicina y tres sitios de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), y intracelularmente posee un grupo amino y un grupo carboxilo terminales seguido por un tramo largo (a partir de Phe188 a Val321) formando seis hojas antiparalelas β ^{24, 25}, ver figura 7.

Los dominios del amino y carboxilo-terminal de P2X7 (AA 352 Y 595) son de mayor tamaño que en otros miembros del subtipo P2X. El dominio C-terminal es crucial para la formación de poros P2X7, transducción y señalización, pues estudios sugieren que P2X7 puede funcionar como un sistema de señalización complejo al interactuar con diversas proteínas intracelulares.

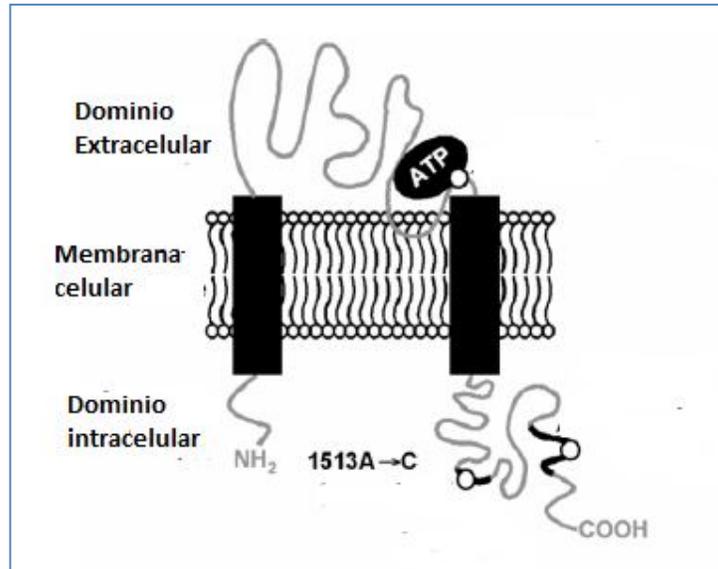


Figura 7. Esquema del receptor P2X7, se pueden observar los dominios intracelulares amino terminal y carboxiterminal. Tomado de Suran L. Fernando, et al. (2005)²⁷.

La región C-terminal también contiene sitios putativos para la interacción con lipopolisacáridos, dominios SH2 y de α -actina²⁸. Se han encontrado similitudes entre la región de hojas β y el dominio catalítico de clase II de la sintetasa aminocil-tRNA sintetetas. Estas hojas β son parecidas a residuos que comprenden el sitio de unión a ATP, desde la sustitución de dos aminoácidos comprendidos en la región, Lys193 y Lys311²⁹.

Los receptores P2X7 mediados por cambios en las concentraciones intracelulares de potasio conducen a la activación de la caspasa-1 y la rápida maduración y la liberación de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β . El aumento de la concentración de IL-1 β a su vez, provoca la inducción de óxido nítrico sintasa, enzima ciclooxigenasa-2 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). La activación de la caspasa-3 también ha sido relacionada con la activación del receptor P2X7 y su posible asociación con los mecanismos citotóxicos, incluyendo la formación de los poros. Los inhibidores de la caspasa 1 y 3 bloquean eficazmente a la activación de P2X7²⁸.

Agonistas del receptor P2X7

Una exposición prolongada a agonistas conduce a la formación de grandes poros en la membrana de la célula. El 2,3 - (benzoil-4-benzoil)-ATP (BzATP) estimula al receptor P2X7 de manera más potente que el ATP, sin embargo no es un agonista selectivo para P2X7, sino también para otros receptores P2X. El ADP (adenosin difosfato) y AMP (adenosin monofosfato) son agonistas muy débiles en el receptor P2X7. Sin embargo, después de una breve exposición al ATP, la eficacia de ADP y AMP aumenta (aunque siguen siendo débiles en comparación con el ATP), esto ha hecho suponer que una breve estimulación inicial con ATP provoca un cambio más prolongado en el receptor, que posteriormente altera su capacidad para discriminar entre ATP, ADP y AMP²².

Antagonistas de receptor P2X7

Existen cinco tipos de bloqueadores (Figura 8), uno de ellos son los iones. El calcio, magnesio, zinc, cobre, y todos los protones inhiben la generación de ATP, disminuyendo la concentración de ATP al orden de micromoles, siendo insuficiente la concentración de ATP el receptor es bloqueado. El bloqueo del receptor es independiente del voltaje. El segundo tipo son los receptores similares a P2X7 como la surimina, PPADS y el inhibidor más potente es el azul brillante G, en concentraciones nanomolares.

El tercer grupo contiene dos grandes cationes orgánicos calmidazolium (en concentración 10 nM), y KN-62. Calmidazolium bloquea también otros canales iónicos incluyendo los canales dependientes de nucleótidos cíclicos. Calmidazolium {1 - [bis (4-clorofenil) metil] -3 - [2 - (2,4-diclorofenil) -2 - (2,4-dichlorophenylmethoxy)-etil]-1Himidazolium} tiene un núcleo imidazolinio cargado, rodeado por cuatro restos clorobencenos. KN-62 es una piperazina [4-[2-[(5-isoquinolinilsulfonil)] metilamino-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil) propiléster fenilol] utilizado como un inhibidor de calcio/calmodulina-dependiente la proteína quinasa tipo II (CaM quinasa II).

La cuarta clase de antagonistas P2X7 es el 17- β -estradiol, se ha reportado que bloquea las corrientes de BzATP. El último, antagonista es un anticuerpo monoclonal²².

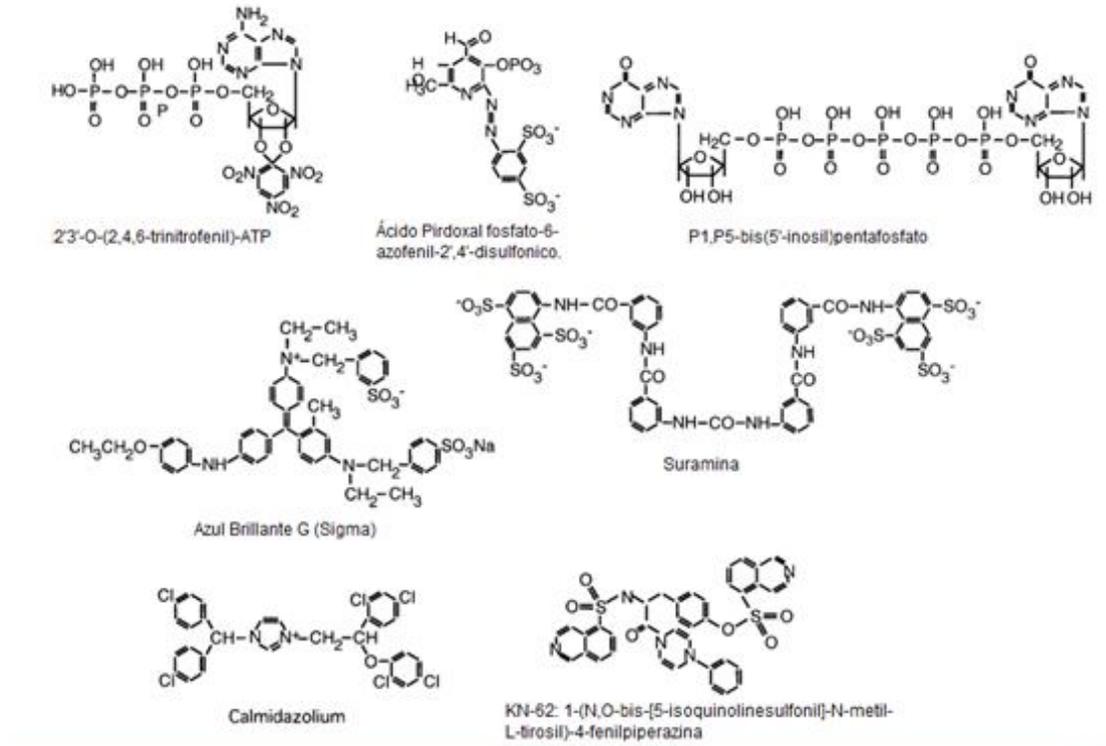


Figura 8. Estructura molecular de los antagonistas del receptor P2X7. Tomado de North R. Alan (2002)²².

Permeabilidad de la membrana plasmática a través del receptor P2X7.

La permeabilidad de este receptor se ha estudiado mediante el uso de colorantes como el etidio y YO-PRO-1, debido a sus propiedades fluorescentes además que se intercalan en los ácidos nucleicos, dando así una medida directa de su entrada en las células²².

El ATP es el ligando para P2X7 receptor ionotrópico²⁴, después de la activación del receptor se abre un canal catiónico de manera reversible que permite el influjo de Na^+ , Ca^{2+} y eflujo de K^+ , provocando la inducción de la apoptosis y la liberación de interleucina madura (IL)-1 β , respectivamente. La estimulación sostenida con dosis mayores de ATP o la estimulación repetida con pulsos secuenciales de ATP, induce la formación de un poro permeable a grandes moléculas de peso molecular (100-457 Da), como N-metil-D-glutamina

(NMDG). Genera en linfocitos B y T un poro con un tamaño molecular de poco más de 300 Da²⁴ (Figura 9).

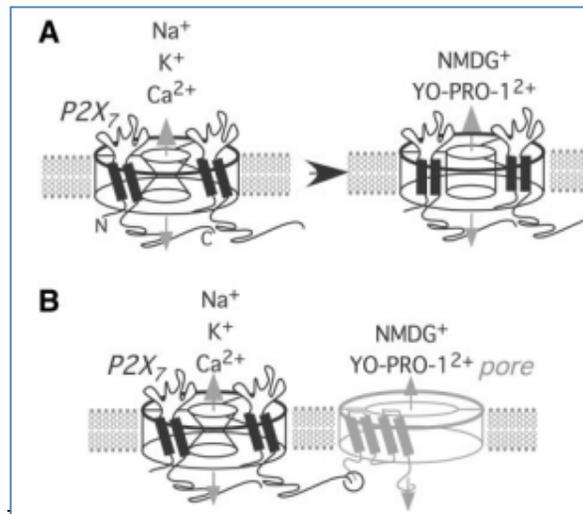


Figura 9. Apertura de canales a través del receptor P2X7 dependiente de ATP; A: La unión de P2X7 con ATP, provoca la apertura del canal por unos milisegundos, lo que provoca un cambio conformacional en el canal al paso de iones pequeños; B: primero se abre el canal para iones pequeños, después de una exposición prolongada de ATP, el receptor activado puede unirse a otra proteína (aún no identificada) que provoque la apertura de canales que permitan el paso de cationes más grandes e inclusive de tintes fluorescentes²².

Muerte celular y el receptor P2X7

La estimulación de P2X7 puede conducir a la apoptosis o necrosis de macrófagos infectados y células epiteliales a través de un proceso que requiere activación por la fosfolipasa D (PLD), dando lugar a la fusión de lisosomas y vacuolas, y la acidificación de las vacuolas, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La inhibición de la señalización P2X7 parece ser crítico para propagación de algunas infecciones, ya que la muerte celular mediada por P2X7 tiene un mayor impacto en el desarrollo de patógenos intracelulares que la muerte de la célula huésped inducida a través de otros receptores de superficie²⁵(figura 10).

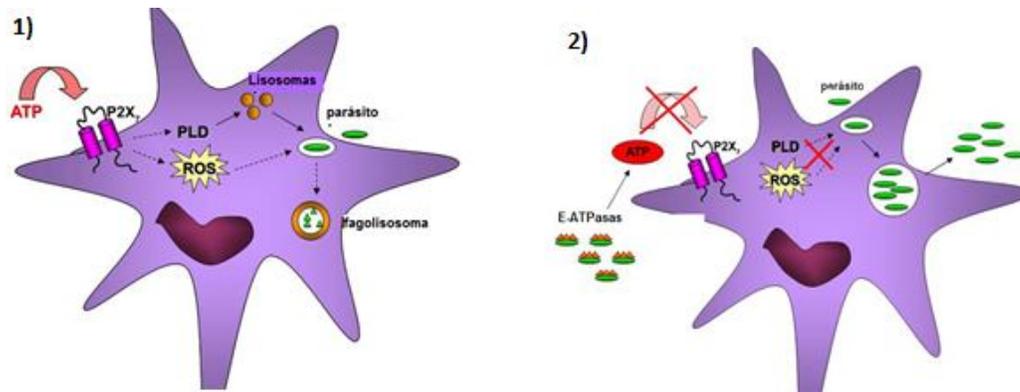


Figura 10. Esquema que ilustra la intervención del receptor P2X7 activado por ATP; 1) En el desarrollo de apoptosis medida por la fosfolipasa D y por las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) que desencadenan en la fagocitosis de las micobacterias, 2) por otro lado al haber ATPasas el proceso de apoptosis por P2X7 se interrumpe lo cual desencadena la diseminación de la micobacteria²⁴.

Polimorfismo 1513A/C

En el polimorfismo del gen *P2X7*, 1513A/C, el residuo 496 (Glu496 a Ala) cambia de ácido glutámico a alanina, debido a un cambio de nucleótidos de una adenina a citosina³⁰, en una zona conservada del carboxilo terminal del gen. Este polimorfismo presenta una frecuencia alélica de 14-18% en las poblaciones caucásicas²³.

Esta región está implicada en las interacciones proteína-proteína, que incluyen sitios de unión a lipopolisacáridos bacterianos, así como la unión a α -actina. Este polimorfismo es de origen natural, y la pérdida de su función causa la incapacidad para desencadenar la formación de poros e inducción de la apoptosis²². Diferentes estudios han demostrado que la homocigosis para el alelo C (C/C) lleva a la casi completa pérdida de la función P2X7²⁹ y alrededor del 50% de reducción en los individuos heterocigotos. En esta pérdida de función es probable que se bloquee la unión de ATP al dominio extracelular del receptor²⁴.

Polimorfismo -762 T/C

Es un SNP en la región promotora del gen *P2X7* en el nucleótido de la posición -762 (C/T) se ha descrito que tiene una asociación protectora contra tuberculosis²⁹, en la población de Gambia se ha reportado que el genotipo CC

está asociado a la disminución de la susceptibilidad a tuberculosis ($P=0.027$, $OR= 0.545$, $IC\ del\ 95\%= 0.318 - 0.934$)³¹, en un reporte en población mestiza mexicana no se encontró asociación con la TB, y aunque aún no es clara la manera en que este polimorfismo confiere protección, se cree que tiene que ver en la regulación de expresión de este gen en diferentes poblaciones²³.

Planteamiento del problema

Debido al desconocimiento de la etiología de la arteritis de Takayasu, y al avance silencioso de esta enfermedad que puede desencadenar complicaciones serias que llevan a la muerte, es necesario realizar estudios que relacionen y analicen las posibles causas del padecimiento, con el fin de tener datos más completos que contribuyan a la comprensión de la enfermedad.

Por otro lado, se sospecha que la tuberculosis pueda estar implicada en la etiología de AT debido a la presencia de infección tuberculosa en los pacientes con arteritis de Takayasu. Un posible vínculo que explique la probable relación entre la tuberculosis y la arteritis de Takayasu es el gen *P2X7*, el cual codifica para un receptor llamado P2X7 que está involucrado en la regulación de diversas funciones tales como: la liberación de interleucinas proinflamatorias y la respuesta inmune a bacterias intracelulares, entre otras. Sin embargo este receptor puede sufrir pérdida de función al ser codificado por los polimorfismos 1513A/C y el polimorfismo -762T/C de la región promotora.

Si el receptor P2X7 disminuye o pierde su función a causa de la variación genética de los polimorfismos antes mencionados, esto conllevaría a una mayor susceptibilidad a infecciones a través de *Mycobacterium tuberculosis* y esto aunado a otros factores puede estar condicionando, a la aparición de la arteritis de Takayasu. Por lo tanto, el conocer si existe asociación entre los polimorfismos antes mencionados con la presencia del gen *IS6110* que está presente en *Mycobacterium tuberculosis* y la enfermedad de Takayasu, nos puede ayudar a conocer más de esta enfermedad, al aclarar si los polimorfismos genéticos del gen *P2X7* están relacionados como un factor de riesgo o bien de protección a la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar la frecuencia de los polimorfismos 1315A/C y -762T/C, del gen *P2X7* en pacientes con arteritis de Takayasu con presencia de *M. tuberculosis*, compararlos con pacientes con tuberculosis y pacientes con aterosclerosis (grupo control), y analizar si existe asociación entre los polimorfismos con la arteritis de Takayasu y tuberculosis.

Objetivos Específicos:

- Determinar la frecuencia del polimorfismo del gen *P2X7* en la región promotora (posición -762) en pacientes con arteritis de Takayasu, pacientes con tuberculosis y el grupo control (un grupo de sujetos con aterosclerosis).
- Determinar la frecuencia del polimorfismo A1513C del gen *P2X7* en individuos mexicanos con arteritis de Takayasu, tuberculosis y aterosclerosis.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados de los pacientes con arteritis de Takayasu y los pacientes con tuberculosis con respecto al grupo control.
- Analizar la presencia del gen *IS6110* específico para *M. tuberculosis* en todos los grupos de estudio.
- Determinar la susceptibilidad de riesgo/protección de los polimorfismos estudiados del gen *P2X7* con la arteritis de Takayasu y TB en una muestra de la población mexicana.

Hipótesis

Las frecuencias de los polimorfismos serán diferentes en los grupos de arteritis de Takayasu y tuberculosis con respecto al grupo de aterosclerosis. Con base a las frecuencias genotípicas de estos polimorfismos, se pudiera hacer una asociación de cierto genotipo como un factor de susceptibilidad o de protección a padecer estas enfermedades en nuestra población de estudio.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Descripción.

Se realizó un estudio retrospectivo de tipo genético, transversal a conveniencia por casos y controles, con un muestreo no probabilístico de casos consecutivos. Se buscaron y confrontaron hallazgos de expedientes obtenidos del departamento de patología con expedientes clínicos para elegir casos y controles. (Revisado por la Dra. Ma. Elena Soto López reumatóloga experta del Instituto Nacional de Cardiología).

Definición de la población

Nuestra población de estudio constó de pacientes mexicanos diagnosticados con arteritis de Takayasu (AT) por el servicio de Reumatología del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez". La clasificación clínica fue definida de acuerdo al Colegio Americano de Reumatología (*ACR; del inglés American College of rheumatology*), en cinco subgrupos de acuerdo a la localización del daño.

Además la población se integró con muestras de individuos mexicanos con tuberculosis, estos fueron confirmados por el diagnóstico de la autopsia, el expediente clínico con la historia clínica de la enfermedad tuberculosa, tiempo de evolución del padecimiento y lugar donde fue tratado, cultivos (baciloscopia) y biopsia según el caso de confirmación de tuberculosis, además de la sintomatología y hallazgo del daño cardiovascular por el cual llegó a este Instituto especializado.

Para el grupo control se estudiaron individuos mexicanos diagnosticados con aterosclerosis. En los pacientes con aterosclerosis se tomó en cuenta el reporte consignado por el patólogo de aterosclerosis con fibrosis en pared arterial, en la capa íntima y media y se analizaron los datos clínicos, historia clínica, tipo de estudios solicitados durante su estancia, hallazgos cardiovasculares, tiempo de evolución con el padecimiento y co-morbilidades.

Tamaño de la muestra

Un total de 30 pacientes con Tb, 33 pacientes arteritis de Takayasu y el grupo control integrado por 69 pacientes con aterosclerosis.

Metodología

Selección de las muestras de aorta. Se buscaron reportes de casos con AT, TB y aterosclerosis en el archivo de Patología con la descripción clínica y patológica completa. En aquellos casos que se contaba con tejidos de aorta conservados en parafina, fueron presentados a dos patólogos expertos, quienes evaluaron las condiciones del tejido, tipo de procesamiento y almacenamiento.

En los casos con AT se buscaron los criterios clínicos con los que se llegó al diagnóstico clínico y reporte de angiografía. Se definió el tipo de arteritis Takayasu de acuerdo a la Clasificación de Hata et al (1997)³².

Criterios de Inclusión:

Aquellos casos de AT que cumplieran más de 4 criterios de acuerdo a ACR y la confirmación por estudio de imagen; además que los bloques de tejido aórtico hubieran sido procesados con la misma técnica, que el material fuera de suficiente y de pureza adecuada.

Se eliminaron aquellos en los que no se logró obtener suficiente material para el procesamiento y extracción de ADN y cuando no se encontraron los expedientes clínicos para evaluar en forma similar para cada grupo.

Extracción de ADN

La extracción del ADN de tejidos embebidos en parafina de los grupos con AT, TB y aterosclerosis, se obtuvo utilizando un kit comercial (Illustra Nucleón Genomic, GE Healthcare) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se utilizó 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 con lavados con etanol al 100%, al

75%, al 50% y por último al 25%. Posteriormente se agregó proteinasa K y se realizó la extracción del ADN con la resina Nucleón. (Anexo 1)

El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro a 260nm y se realizó el ajuste para concentrar el ADN a 200ng/μL y a 10ng/μL, (anexo 2). El ADN obtenido se almacena a -70°C hasta su utilización.

Determinación genotípica.

La presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras se confirmó a través de la secuencia de inserción *IS6110* específica para identificar a *M. tuberculosis* y a *M. bovis*, esta secuencia tiene una gran sensibilidad en PCR³³, su presencia y número de copias varía entre cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, este fragmento se encuentra en mayor frecuencia y se repite más veces en *M. tuberculosis*^{34, 35} (figura 11).

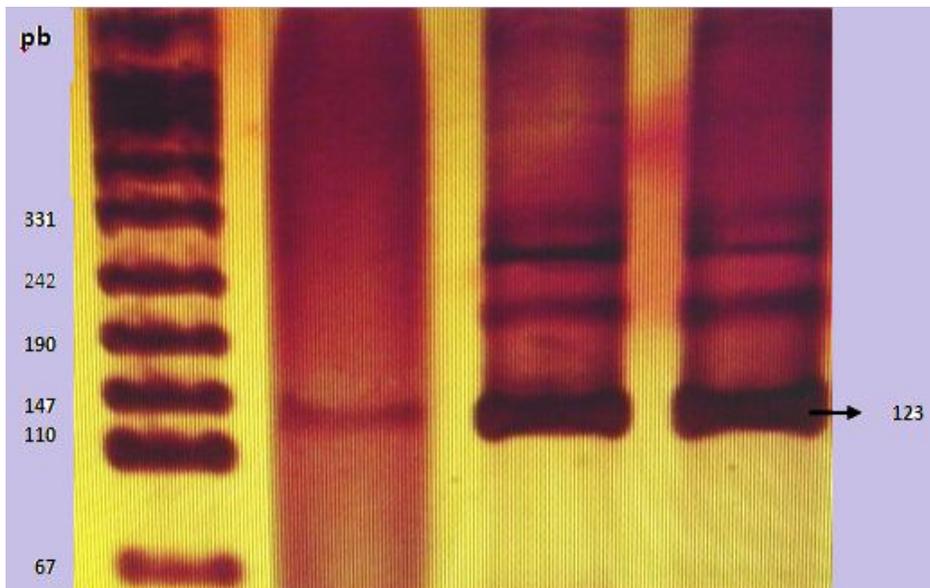


Figura 11. Amplificación del gen *IS6110* de *M. tuberculosis* en gel de acrilamida al 10% teñido en nitrato de plata. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: amplificado para el gen de inserción *IS6110* (123 pb). Carril: 3 y 4 DNA de *M. tuberculosis* tomado de una línea celular H3Rv (control positivo).

Mediante la amplificación de esta secuencia, utilizando los siguientes cebadores: *IS6110* Forward (5'-CCTGCG AGC GTA GGC, GTC GG-3') y *IS6110* Reverse (5'-CTC GTC CAG CGC TTC GG-3') de acuerdo a Negi et al, 2007³⁶, se utilizó un marcador de peso molecular de 132pb.

El control positivo se obtuvo de cadenas extraídas de líneas celulares de *Mycobacterium tuberculosis* HRv37, provenientes del Departamento de biología celular del Instituto Nacional de Cardiología.

El sitio polimórfico de la región promotora (posición -762) se determinó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polimerase Chain Reaction) mediante una variante, alelo específico o PCR anidada. Los reactivos para la amplificación por PCR se pueden ver en el (anexo 3). Las condiciones: las temperaturas y el número de ciclos son iguales para las dos PCR de las que consta este ensayo, los primers o iniciadores para cada una de las PCR se muestran en la figura 12.

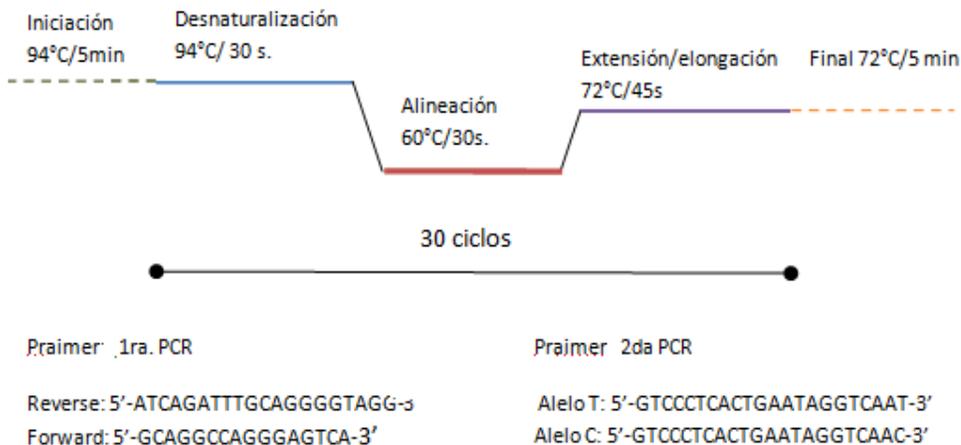


Fig. 12 Condiciones específicas para PCR anidada para la determinación del polimorfismo genético -762.

La amplificación del producto respectivo de la PCR anidada se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o PAGE (*del inglés Poly-Acrylamide Gel Electroforesis*) al 8%, la preparación del gel y las condiciones de corrida del gel se muestra en el (anexo 4), que fue revelado por tinción de plata, ver Anexo 5, dando como resultado bandas de 184 pb que corresponde al alelo T (alelo silvestre) y una banda de 102 pb correspondiente al alelo C (alelo mutante) (fig. 13).

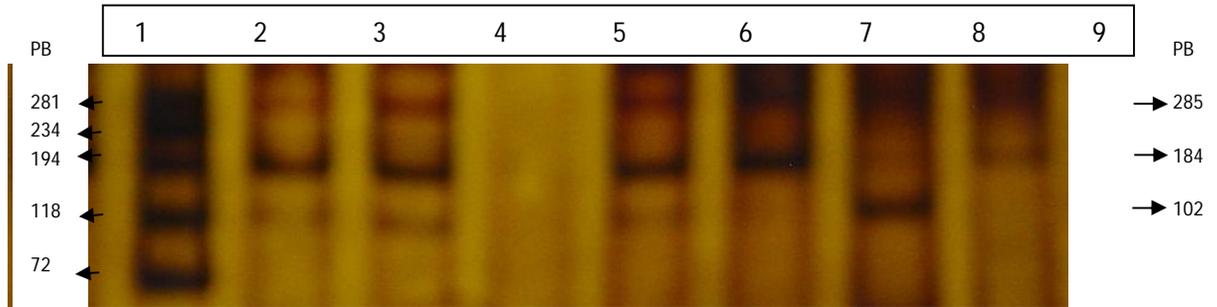


Figura 13. Gel de acrilamida al 10%, teñido en nitrato de plata. Se observan las bandas para el gen -762. Carril 1, 7 y 9 (TT), carril 2 (marcador de peso molecular X174RF DNA/Hae III), carril 3,4, 6 (TC), carril 8 (CC).

Para la amplificación del polimorfismo A1315C se realizó mediante el ensayo de genotipificación Taqman 5' exonucleasa en un sistema de PCR en tiempo real, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, USA). Cada SNP (alelo y genotipo) fue definido manual y automáticamente con el programa de discriminación alélica (7300 System SDS Software® by Applied Biosystems).

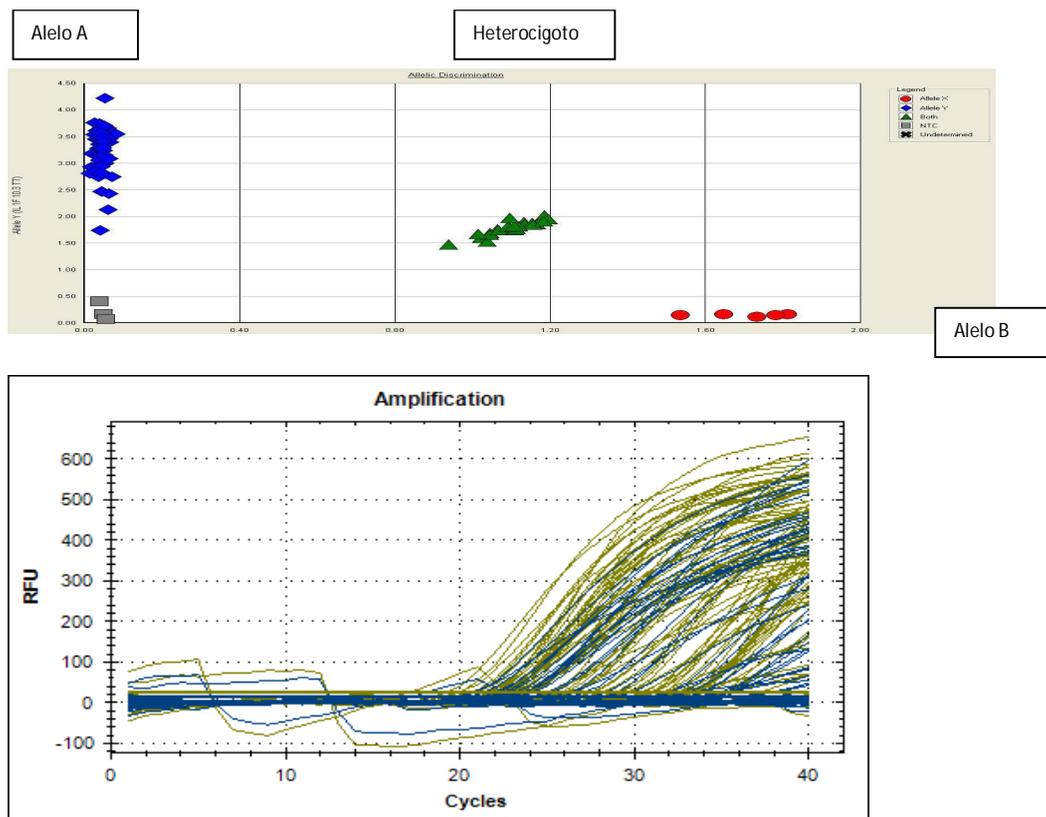


Figura 14. Discriminación alélica con la técnica de PCR en tiempo real.

Análisis Estadístico.

Las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de los polimorfismos -762 y A1315C del gen *P2X7* se obtuvieron por conteo directo. La significancia de las diferencias entre los grupos fueron determinados usando *Mantel-Haenzel chi-squared analysis*, combinado con tablas de contingencia de 2 x 2 usando *EPISTAT* software de estadística (Versión 5.0; USD incorporado en 1990, Stone Mountain Georgia). Prueba de Fisher se utilizó, si las cantidades en cualquier celda de la tabla de contingencia fue menor que cinco. El riesgo relativo con intervalos de confianza (IC) del 95% se calculó como el cociente de probabilidad. La significancia estadística fue aceptada con un valor de alfa de $\leq 0,05$.

RESULTADOS:

De un total de 57560 autopsias revisadas (la figura 14, representa la muestra de autopsia), se detectaron 181 casos que cumplieron los criterios de inclusión; de estos, 2 fueron eliminados debido a que las muestras no fueron preservadas adecuadamente, en 13 casos el tejido aórtico no fue suficiente para la obtención de ADN, en 24 no había información clínica y/o de laboratorio disponible, 10 más presentaron múltiples co-morbilidades y 6 habían presentado enfermedad tuberculosa antes de su admisión hospitalaria.

El tamaño de muestra final fue de 132 tejidos de aorta, esta muestra se dividió en dos grupos de estudio y un grupo control interno. Treinta muestras correspondieron a tuberculosis (TB), 33 de arteritis de Takayasu (AT) de acuerdo a los criterios de ACR y 69 a aterosclerosis (At) que pertenecen al grupo control interno (tabla 4). El control interno se realizó con el fin de tener un grupo que representara las condiciones del manejo de la muestra.

	N	%
Control Aterosclerosis	69	52.3
Tuberculosis	30	22.7
Arteritis de Takayasu	33	25

Tabla 4. Pacientes estudiados divididos por enfermedad.

La edad al momento del diagnóstico para las enfermedades Tb, AT y At fueron 22 ± 13 , 22 ± 13 y 57 ± 10 ($P= 0.0001$), respectivamente; el nivel socioeconómico fue similar entre los pacientes con AT y Tb, mientras que el grupo de aterosclerosis tuvo una tendencia de media a alta aunque sin diferencias significativas entre los grupos.



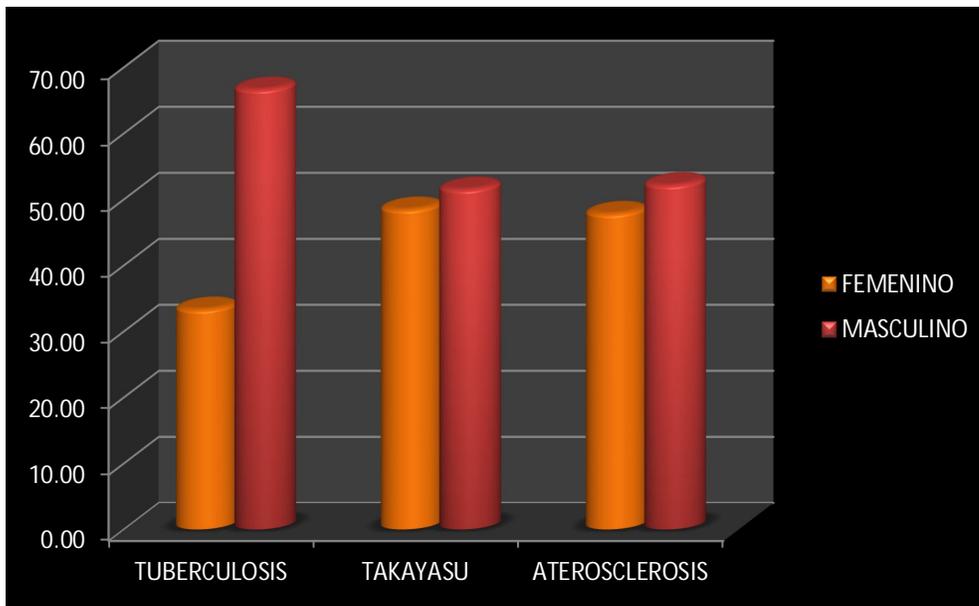
Figura 14. Representan la muestra de autopsia constituida por el corazón, la aorta y los riñones. El prolapso de la válvula aórtica, el engrosamiento y la irregularidad de la aorta en sus diversos segmentos, con una notable constricción de las arterias renales. El lado derecho muestra un primer plano de la aorta y de las arterias renales, con engrosamiento evidente de sus paredes.

El daño histológico de los tejidos fue analizado por un especialista en patología experta en morfometría, quien evaluó la presencia de fibrosis y de infiltrado inflamatorio (ver tabla 5).

Localización aortica	n	Takayasu	Tuberculosis	Aterosclerosis	P
Sin lesion aortica (%)	9		9 (30)		NS
Aorta ascendente (%)	9	5 (15.1)	0 (0)	4 (5.8)	NS
Aorta descendente (%)	7	0 (0)	2 (6.6)	5 (7.2)	NS
Aorta abdominal (%)	51	7 (21.2)	9 (30)	35 (50.7)	0.001
En toda la trayectoria aortica (%)	56	21 (63.6)	10 (33.3)	25 (36.3)	0.001
Total	132	33	30	69	NS
Capa aortica dañada	n				
Intima n (%)	81	9 (27)	13(43.3)	59 (85.5)	0.001
Media n (%)	8	2 (6)	1 (3.3)	5 (7.2)	NS
Adventicia n (%)	22	17 (52)	2 (6.6)	3 (4.3)	0.001
Todas las capas n (%)	9	5 (15)	2 (6.6)	2 (2.9)	0.024
Ninguna n (%)	12	0	12 (40)	0	NS

Tabla 5. Sitios de localización de daño en aorta.

Se analizaron un total de 59 mujeres y 73 hombres de los cuales para el grupo de tuberculosis fueron 10 mujeres y 20 hombres, para el grupo de Takayasu, fueron 16 mujeres y 17 hombres y para el grupo de aterosclerosis fueron 33 mujeres y 36 hombres. (Gráfica 1)



Gráfica 1. Pacientes divididos por género y enfermedad (%).

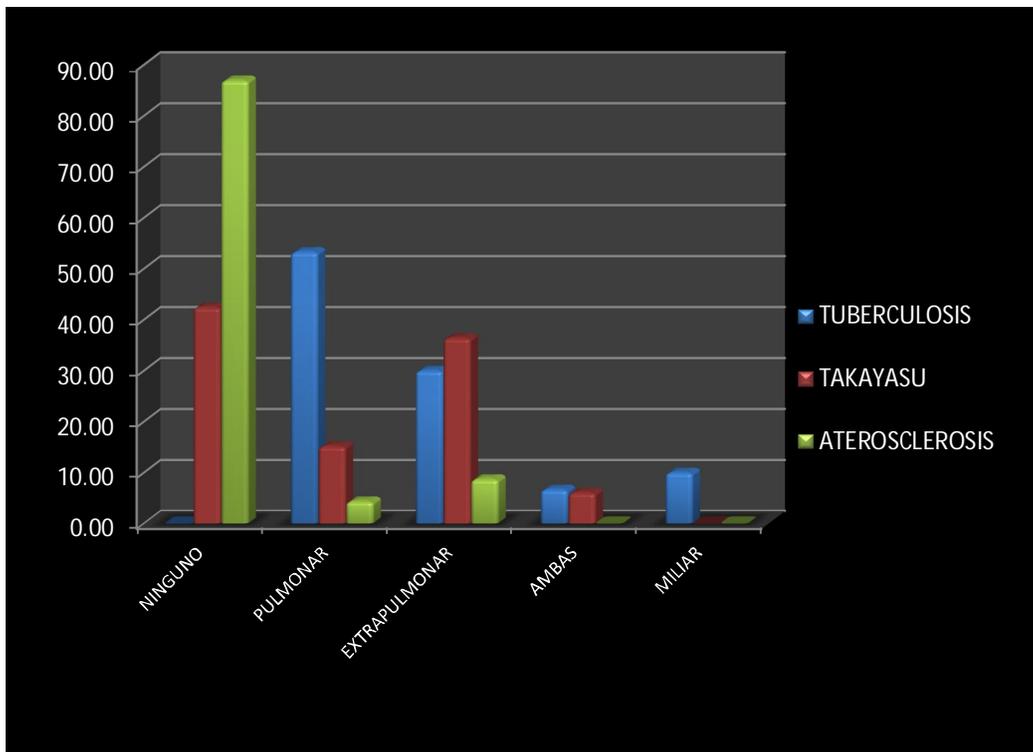
De acuerdo a la clasificación de Hata et al,(tabla 2) los pacientes con arteritis de Takayasu, el 75 % fueron del tipo V, de los cuales, el 33% presentaron involucramiento en las arterias coronarias y pulmonar, el 21% con características combinadas con el grupo IIb y IV (una persona con este tipo de AT falleció por tuberculosis), 12% con el tipo V comprometiendo únicamente la arteria coronaria, y el 9 % con el tipo V con arteria pulmonar involucrada; mientras que el 6% con el tipo IV involucrando a las arterias coronaria y pulmonar, el 6% tipo IV con arteria coronaria involucrada, el 6% con tipo IIa con daño en arteria pulmonar y coronaria, el 3% con el tipo II b con ambas arterias involucradas y el restante 3% con tipo I involucrando a la arteria coronaria.

De los casos estudiados con tuberculosis, el sitio de infección más frecuente fue en el pulmón con 78.8%, el sitio más afectado en la tuberculosis extrapulmonar fue el riñón con un 9% de incidencia.

Al hacer una revisión de los 3 grupos de estudio en relación al tipo de tuberculosis reportada se encontró que en el grupo de tuberculosis predominó el tipo de Tb pulmonar (53.3%) (P= 0.0001). Para el grupo de Takayasu el 42% no presentó tuberculosis, mientras que el resto predominó la Tb extrapulmonar (P= 0.003). Finalmente, para el grupo de aterosclerosis, el 86.9% no presentó ningún tipo de tuberculosis y el 13.04% de las muestras tuvo enfermedad tuberculosa. (Ver tabla 6 y gráfica 2)

	TUBERCULOSIS		TAKAYASU		ATEROSCLEROSIS	
	N	%	N	%	N	%
NINGUNO	0	0.0	14	42.4	60	86.9
PULMONAR	16	53.3*	5	15.1	3	4.3
EXTRAPULMONAR	9	30.0	12	36.3**	6	8.7
AMBAS	2	6.7	2	6.1	0	0.0
MILIAR	3	10.00	0	0	0	0.0
Total	30	100.00	33	100	69	100

Tabla 6. Relación entre el tipo de tuberculosis identificada y el grupo de pacientes de estudio. * P= 0.0001 vs. Tipo de lesión del mismo grupo. ** P= 0.003 vs. Tipo de lesión del mismo grupo.



Gráfica 2. Pacientes divididos por enfermedad de acuerdo a la ubicación de la tuberculosis.

Se realizó la comparación entre genotipos en cada grupo de estudio para los SNP's del gen *P2X7*, (ver Tabla 7) obteniéndose resultados estadísticamente significativos.

El grupo de tuberculosis para el SNP 1513A/C el genotipo AA representó el 66.60%, con una diferencia significativa con respecto al genotipo AC con 33.3%

y 0% en CC (P= 0.020, OR= 4.0, IC al 95%= 1.36-11.55). En este grupo no se encontraron datos significativos en el análisis del polimorfismo -762.

En el grupo de Takayasu la frecuencia del genotipo 1513 AA fue de 63.64%, con una diferencia significativa con respecto a 1513 AC con porcentaje de 30.3% (pC= 0.013, OR: 4.02, IC del 95%: 1.45-11.1) y también hubo significancia con respecto a genotipo CC (6%). En el mismo grupo, pero del polimorfismo -762 el alelo TT (76.6%) tuvo una diferencia estadísticamente significativa al comparar vs. TC (26.6%) y con CC (6.6%), (TT vs TC; pC= 0.0006, OR= 7.18, IC del 95%= 2.41-21.31).

En el grupo control (aterosclerosis) la comparación entre los genotipos AA (53.6%) contra AC (30.4%) y CC (15.9%) del SNP 1513, fue significativa (AA vs AC; pC=0.043, OR=2.2, 95% CI= 1.08-4.47). En el mismo grupo el comportamiento del polimorfismo -762, dio significancia a la evaluación de TT vs TC (pC=0.0003, OR: 7.36, IC del 95%: 1.8-7.16), el genotipo TT tuvo una frecuencia de 63.7%.

POLIMORFISMO A 1 5 1 3 C						
	Tuberculosis		Takayasu		Aterosclerosis	
	N	%	N	%	N	%
AA	20	66.66*	21	63.64*	37	53.62*
AC	10	33.33	10	30.30	21	30.43
CC	0	0	2	6.06	10	15.94
A	50	83.30	52	78.70	95	68.80
C	10	16.60	14	21.30	43	31.10
POLIMORFISMO -762						
TT	17	56.67+	23	76.6+	44	63.37+
TC	11	36.66	8	26.6	22	31.88
CC	2	6.67	2	6.6	3	4.35
T	45	75	54	81.80	110	79.70
C	15	25	12	18.20	28	20.21

Tabla 7. Frecuencias alelicas y genotípicas para los polimorfismos A1513C y -762 de las muestras de estudio, *P<0.05 = AA vs AC y CC; + P<0.05 = TT vs TC y CC.

Considerando sólo las muestras que dieron positiva a la secuencia *IS6110* específica para *M. tuberculosis*, el número de individuos con presencia de *Mycobacterium tuberculosis* para cada grupo fue: tuberculosis 23 (76.6%), Takayasu 21 (63.6%) y aterosclerosis 17 (24.6%). Posteriormente, se calculó las frecuencias para ambos polimorfismos divididos de acuerdo a la presencia o no del gen de inserción *IS6110*, en los tres grupos de estudio (tabla 8).

Los siguientes análisis se realizaron utilizando sólo las frecuencias de las muestras positivas a *IS6110*. A) Se evaluaron las frecuencias genotípicas en cada grupo en ambos polimorfismos. Los resultados para el polimorfismo 1513A/C fueron: de la comparación de genotipos AA vs CC del grupo de aterosclerosis ($P= 0.045$, $OR= 4.17$, IC del 95%=1.10-14.55), para el mismo polimorfismo pero en el grupo de tuberculosis los genotipos de AA vs AC mostraron significancia ($pC= 0.033$, $OR= 3.75$, IC del 95%= 1.22-11.39). Para el polimorfismo -762 en este mismo análisis, no hubo datos estadísticamente significativos.

B) Se compararon las frecuencias entre los grupos de estudio en relación al grupo control. En el polimorfismo 1513A/C se encontró una diferencia significativa entre el genotipo AA del grupo de Takayasu (33.3%) vs el grupo control (15.9%) ($P= 0.004$) y del genotipo AA del grupo de Tuberculosis (53.3%) con respecto al grupo de aterosclerosis ($P= 0.003$). En el polimorfismo -762 el genotipo TT de Takayasu vs aterosclerosis tuvo una diferencia significativa ($P= 0.004$) así como el genotipo TT de tuberculosis contra el genotipo TT del grupo control ($P= 0.0006$).

		<i>IS6110</i>	ATEROSCLEROSIS	TAKAYASU	TUBERCULOSIS
POLIMORFISMO A1513C					
GENOTIPO	AA	POSITIVO n (%)	11 (15.9) ^δ	11(33.3)	16 (53.3) ^δ
		NEGATIVO n (%)	26 (37.7)	10(30.3)	4 (13.3)
		TOTAL	37 (53.6)	21 (63.6)	20 (66.6)
	AC	POSITIVO n (%)	3 (4.3)	9 (27.3)*	7(23.3)*
		NEGATIVO n (%)	18 (26.1)	1 (3)	3 (10)
		TOTAL	21 (30.4)	10 (30.3)	10 (33.3)
	CC	POSITIVO n (%)	3 (4.3)	1 (3.0)	0
		NEGATIVO n (%)	8 (11.6)	1 (3.0)	0
		TOTAL	11 (15.9)	2 (6.0)	0
POLIMORFISMO -7 6 2					
GENOTIPO	TT	POSITIVO n (%)	10 (14.5)	16(48.5)*	13 (43.3)*
		NEGATIVO n (%)	34 (49.2)	7 (21.2)	4 (13.3)
		TOTAL	44 (63.7)	23 (69.7)	17 (56.6)
	TC	POSITIVO n (%)	6 (8.7)	5 (15.1)	9(30)
		NEGATIVO n (%)	16 (23.2)	3 (9.1)	2 (6.6)
		TOTAL	22 (31.9)	8 (24.4)	11 (36.6)
	CC	POSITIVO n (%)	1 (1.4)	0	0
		NEGATIVO n (%)	2 (2.9)	2 (6.1)	2 (6.6)
		TOTAL	3 (4.3)	2 (6.1)	2 (6.6)

Tabla 8: frecuencias de los SNP's divididos en positivos y negativos a la frecuencia de identificación de M. tuberculosis. ^δP<0.05 vs AC y CC positivos para *IS6110* y *P<0.05 vs aterosclerosis positivos a *IS6110*.

Evaluación de la asociación entre polimorfismos de *P2X7* y el tipo de la tuberculosis.

Se analizaron las frecuencias genotípicas de los dos SNP's del gen *P2X7*, de acuerdo a la localización o sitio de la tuberculosis. Debido al bajo número de sujetos homocigotos para 1513C y -762C, éstos se unieron a los sujetos heterocigotos para su análisis (tabla 9). En esta tabla observó una significancia para el polimorfismo 1513A/C al comparar el total del grupo de TB pulmonar con genotipo AA (29.3%) contra el total de TB pulmonar con genotipos AC+CC (12.1%) (pC = 0.05, OR = 2.6, IC del 95%= 1.05 a 6.59).

		Tipo de Tb	Tuberculosis n (%)	Takayasu n (%)	Aterosclerosis (control) n (%)	Total n (%)
POLIMORFISMO A 1513C	Genotipo AA	Tb pulmonar	11 (36.6)	4 (21.0)	2 (22.2)	17 (29.3)*
		Tb Extrapulmonar	5 (16.6)	5 (26.3)	3 (33.3)	13 (22.4)
		Ambas	1 (3.3)	1 (5.3)	0 (0)	2 (3.4)
		Miliar	3 (10)	0 (0)	0 (0)	3 (5.2)
	GenotipoAC+cc	Tb pulmonar	5 (16.6)	1 (5.3)	1 (11.1)	7 (12.1)
		Tb Extrapulmonar	4 (13.3)	7 (36.8)	3 (33.3)	14 (24.1)
		Ambas	1 (3.3)	1 (5.3)	0 (0)	2 (3.4)
		Miliar	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL			30 (100)	19 (100)	9 (100)	58 (100)
POLIMORFISMO -762	Genotipo TT	Tb pulmonar	9 (30)	5 (26.3)	2 (22.2)	16 (27.6)
		Tb Extrapulmonar	4 (13.3)	7 (36.8)	3 (33.3)	14 (24.1)
		Ambas	2 (6.6)	2 (10.5)	0 (0)	4 (6.9)
		Miliar	2 (6.6)	0 (0)	0 (0)	2 (3.4)
	GenotipoTC+cc	Tb pulmonar	7 (23.3)	0 (0)	1 (11.1)	8 (13.8)
		Tb Extrapulmonar	5 (16.6)	5 (26.3)	3 (33.3)	13 (22.4)
		Ambas	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		Miliar	1 (3.3)	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)
TOTAL			30	19	9	58

Tabla 9: frecuencias de los polimorfismos del gen P27 positivos para la secuencia de inserción, según el tipo de tuberculosis diagnosticada. *pC= 0.05 Vs AC+CC Tb pulmonar.

Además se encontraron diferencias aunque sin significancia estadística como: en el SNP 1513 del grupo de Takayasu, con genotipo AA (26.3%) tuvo menor frecuencia que los genotipos AC+CC (36.8%) para tuberculosis extrapulmonar. Mientras que el polimorfismo -762, en el total de TB pulmonar genotipo TT (27,6%) fue más frecuente con respecto a los genotipos CT + CC (13,8%) del mismo tipo de tuberculosis. Por último de manera general para ambos SNP's el grupo de tuberculosis tuvo las frecuencias más altas en TB pulmonar, en tanto el grupo de Takayasu encontró los porcentajes elevados en TB extrapulmonar, este comportamiento también lo presentó el grupo control (aterosclerosis).

También se investigó las frecuencias de estos polimorfismos en diversas poblaciones para sujetos con tuberculosis (tabla 10), así como para los grupos control (tabla 11), en la revisión bibliográfica que se hizo todos los grupos

control son individuos sanos a diferencia con este trabajo en donde el grupo control son muestras con aterosclerosis; esta búsqueda se realizó con el fin de comparar la carga genética en distintas poblaciones en relación a los obtenidos en este estudio. El comportamiento de nuestro grupo control fue el mismo al reportado por Niño-Moreno et al (2007) para la población mexicana.

FRECUENCIA %					
Población	A1513C		-762T/C		Referencia
	A	C	T	C	
Mexicana	76.50	23.50	83.33	16.67	En este estudio (todas las muestras)
Mexicana	84.78	15.22	79.54	20.46	En este estudio (sólo muestras IS6110 +)
Gámbense	89.23	10.77	74.61	25.39	Li et al. (2002) ³¹
Australiana vietnamita	69.76	30.24			Fernando et al. (2007) ³⁷
Mestiza mexicana	73.94	26.06	76.08	23.92	Niño-Moreno et al. (2007) ²³ .
Rusa caucásica	79.52	20.48	67.22	32.78	Mokrousov et al. (2008) ³⁸
China Han	72.39	27.61	47.43	52.57	Xiao et al. (2009) ³⁹
Asiática Hindú	74.67	25.33	47.43	52.57	Sambasivan al. (2010) ³⁷
Peruana	83.73	16.27			Taype CA (2010) ⁴⁰
Tunecina	80	20	75	25	Walid et al (2010) ⁴¹
Asiática Londinense	69.76	30.24			Fernando et al. (2007) ³⁷
Asiática Australiana	71.21	28.79			

Tabla 10. Frecuencias de los polimorfismos A1513C y -762 T/C en diferentes poblaciones con tuberculosis.

El reporte de las frecuencias para el polimorfismo A1315C en las poblaciones consultadas comparando los casos de estudio con los controles, tenemos un incremento en la frecuencia del alelo A en los casos controles, y viceversa para el alelo C, mientras que los resultados en este estudio marcan una tendencia

contraria a lo reportado. En las frecuencias para polimorfismo -762 T>C, no hay una tendencia marcada, mientras los datos generados a partir de las poblaciones control de Gambia, de Túnez, la población China Han y la mexicana (incluyendo éstos resultados) tienen valores más altos para el alelo C comparándolos con los tuberculosos, en tanto la población rusa caucásica y asiática hindú muestra un comportamiento inverso.

Población	Frecuencia %				Referencia
	A1513C		-762T/C		
	A	C	T	C	
Mexicana (aterosclerosis)	68.80	31.20	79.70	20.21	En este estudio (todas las muestras)
Mexicana (aterosclerosis)	73.53	26.47	76.47	23.53	En este estudio (sólo muestras IS6110 +)
Gámbense	92.42	7.58	67.15	32.85	Li et al. (2002) ³¹
Australiana vietnamita	79.34	20.66			Fernando et al. (2007) ³⁷
Mestiza mexicana	80.90	19.10	66.36	33.64	Niño-Moreno et al. (2007) ²³ .
Rusa caucásica	86.90	13.10	30.70	69.30	Mokrousov et al. (2008) ³⁹
China Han	73.04	26.96	28.25	71.75	Xiao et al. (2009) ³⁸
Asiática Hindú	81.5	18.5	60.5	39.5	Sambasivan al. (2010) ³⁷
Peruana	92.42	7.58			Taype CA (2010) ³⁸
Tunecina	83	17	21	79	Walid et al (2010) ⁴⁰
Asiática Londinense	79.34	20.66			Fernando et al. (2007) ⁴¹
Asiática Australiana	55.00	45.00			

Tabla 12. Frecuencias de los polimorfismos A1513C y -762 T/C en grupos control (sanos).

Discusión

La arteritis de Takayasu es una enfermedad poco común que tiene mayor frecuencia en países como Japón, India y México, con una incidencia de entre 1,2 y 2,6 casos/millón/año⁴².

La etiología de la AT no está completamente entendida, pero parece ser multifactorial, involucrando agentes infecciosos (como *Mycobacterium tuberculosis*, y diferentes tipos de virus), autoinmunidad e influencia genética. La Tuberculosis puede permanecer sin diagnóstico por años debido a que cursa con un daño crónico, con un tratamiento potencialmente de por vida con complicaciones.

Mycobacterium tuberculosis se ha encontrado que puede causar infecciones en sujetos inmunocompetentes e inmunocomprometidos y causar una patología en sitios a nivel pulmonar y extrapulmonar. La mayoría de los estudios en *Mycobacterium tuberculosis* se han enfocado sobre infecciones a nivel pulmonar, mientras que a nivel extrapulmonar, han sido pobremente exploradas. Sin embargo, se conoce que la tuberculosis extrapulmonar presenta entre el 10% al 20% de los casos con tuberculosis.

Las edades al momento del diagnóstico de las enfermedades de los diversos grupos de estudio son congruentes con la enfermedad correspondiente, para el grupo de Takayasu y el de tuberculosis, la edad fue de 22 ± 13 . La arteritis de Takayasu se presenta por lo general en la segunda o tercera década de la vida, con un retraso de meses a años desde el primer síntoma al diagnóstico (Albizzatti Jorge et al, 2005)⁴². Según la OMS el grupo más vulnerable a padecer tuberculosis son los adultos jóvenes para esta enfermedad⁴³, que concuerda con nuestros datos. Mientras que para el grupo control (aterosclerosis) la edad fue de 57 ± 10 , debido a que en este padecimiento el desarrollo ocurre entre los 40 - 50 años (Bourlon Cuéllar RA et al, 2010)⁴⁴.

La AT es una enfermedad inflamatoria que al desarrollar los síntomas que permiten su diagnóstico el compromiso vascular suele ser múltiple y las arterias afectadas más frecuentemente son las subclavias, las carótidas, las vertebrales y las renales³⁷, en este trabajo las muestras del grupo de Takayasu en su

mayoría presentaron daño en toda la aorta dentro del grupo V según la clasificación de Hata et al.

Nuestro datos como se esperaba muestran diferencias en la localización en las lesiones aórticas, con un alta proporción en la región abdominal y en la capa íntima en los pacientes con aterosclerosis, mientras que en los pacientes con arteritis de Takayasu mostraron una alta proporción en todo el arco aórtico y la capa adventicia. El proceso inflamatorio en la AT comienza en la adventicia, después en la media hay infiltración de células mononucleares y granulomas, la destrucción de las células del músculo liso en las arterias conduce a un debilitamiento y dilatación de la pared, seguido de la deposición ácido mucopolisacárido y la fibrosis que se producen en la íntima (Tann Oliver R et al, 2008; Kothari SS 2002) ^{5,45}. Lo anterior justifica el porqué la mayor parte de las muestras para el grupo de Takayasu tuvieron el daño en la adventicia.

Sin embargo, una alta frecuencia de daño pulmonar se observó en los pacientes con tuberculosis, mientras que las lesiones a nivel extrapulmonar se observaron más frecuentemente en el grupo de Takayasu. Una posible explicación es que la arteritis de Takayasu se ha relacionado con infecciones previas de tuberculosis y algunas evidencias clínicas muestran la presencia del bacilo latente, el cual puede ser activado posteriormente debido al decremento del metabolismo dependiente del estrés ambiental y los mecanismos de evasión de la micobacteria. Estos datos parecen ser consistentes con hipótesis previas respecto a la posibilidad de asociación con AT y *Mycobacterium* por una infección previa en estados tempranos como ha sido postulado (Serratrice et al, 2008)⁴⁶.

Por otro lado, durante la revisión del expediente clínico de los grupos de aterosclerosis y Takayasu, había pacientes que además padecieron de algún tipo de tuberculosis, siendo la tuberculosis extrapulmonar la más frecuente en las muestras de estos grupos. Al corroborar la presencia de *M. tuberculosis* con la presencia de la secuencia de inserción *IS6110*, específica para esta bacteria, obtuvimos valores diferentes a los reportados en los expedientes clínicos debido a que esta prueba es más específica y sensible que la prueba de la Tuberculina (PPD) o que el análisis microscópico (BAAR) para *M. tuberculosis*,

por otro lado, hay que considerar que la muestra se obtuvo de la aorta y la tuberculosis principalmente afecta el pulmón, por tanto, no se espera un aumento considerable en la aorta con la presencia de la micobacteria, además la tuberculosis también es causada por otras micobacterias.

El receptor P2X7 abre canales dependientes de ATP potenciando la respuesta inmune innata, activando la apoptosis, y la activación en cascada de caspasas. La activación de P2X7 en las plaquetas tiene un efecto citolítico para las células, los derivados de nucleótidos de adenina conducen a la permeabilidad de poros (900Da)⁴⁷, además desencadena diversos eventos de señalización y también el receptor P2X7 es sensible a mensajeros sinergistas con lipopolisacáridos (LPS) dando lugar a la producción de mediadores proinflamatorios en monocitos y macrófagos, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF- α), IL-1, IL-18, y ácido nítrico.

Los receptores P2X7 están regulados en los macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios (el interferón [IFN- γ], factor de necrosis tumoral y lipopolisacáridos), debido a la estimulación con ATP, se forman grandes poros en la membrana no selectivos que son permeables a moléculas de 0,9 kDa, lo que da como resultado la muerte de los macrófagos por una combinación de apoptosis y lisis osmótica (apolysis), que se induce en los macrófagos infectados para matar micobacterias intracelulares rápidamente.

La pérdida de función del receptor P2X7 a través de los polimorfismos A1513C y 762T/C del gen *P2X7* podría estar implicado en la incidencia de infección tuberculosa en los pacientes con AT y con la etiología de la arteritis de Takayasu, debido a que este receptor está involucrado en la regulación inflamatoria que presentan ambos padecimientos y también juega un papel importante en la muerte de microorganismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* principal agente etiológico de la tuberculosis.

Relación del polimorfismo A1513C y los grupos de estudio.

Algunos reportes han mostrado que la sustitución de ácido glutámico por alanina en la posición 496 en el exón 13 da como resultado la expresión de un receptor de P2X7 no funcional en los macrófagos en sujetos homocigotos en

este locus, y la mayoría de los reportes han mostrado diferencias en el polimorfismo A1513C del gen *P2X7* con la tuberculosis (Fernando, et al., 2007; Nino-Moreno *et al.*, 2007; Sambasivan *et al.*, 2010). Estudios recientes han mostrado que el polimorfismo Glu-496 Ala conlleva a una disminución de la respuesta inmune mediada por ATP y deficiencia en la muerte de la micobacteria por los macrófagos y liberación de interleucinas como IL-1 β y IL-18 de monocitos (Less et al, 2010). Por lo tanto, el polimorfismo en *P2X7* podría estar contribuyendo a la susceptibilidad y resistencia a TB en diferentes poblaciones a través del mundo.

Al hacer el análisis de las frecuencias para éste polimorfismo del gen *P2X7* se encontró un aumento en la frecuencia del genotipo AA así como del alelo A en todos nuestros grupos de estudio. Nuestros resultados fueron similares a los previamente reportados para Lupus Sistémico Eritematoso (LEG) y en artritis reumatoide (AR) en una población mexicana (Portales-Cervantes, 2010)⁴⁸, sin embargo en este reporte no se encontró una aparente correlación entre los niveles (aumentados o disminuidos) de expresión de *P2X7* en diferentes tipos celulares con las frecuencias genotípicas de 1513A/C en pacientes mexicanos con LEG o AR. Se ha reportado en población Vietnamita-Australiana (Fernando *et al.*, 2007) así como en una población China (Xiao *et al.*, 2009) donde no hubo asociación entre el polimorfismo 1513 A/C y la resistencia o la susceptibilidad hacia la tuberculosis activa.

Hasta la fecha no hay reportes en pacientes con arteritis de Takayasu y su relación con el gen de *P2X7*, no obstante el hecho de encontrar frecuencias elevadas para el genotipo AA así como el alelo A en los pacientes con esta enfermedad pueden explicarse por una mejor respuesta inflamatoria, la cual aunada a otros factores podría exacerbar la respuesta y por lo tanto que este genotipo represente riesgo al desarrollo de una enfermedad inflamatoria como lo es la AT.

Por otro lado, este gen presenta otros polimorfismos que pueden estar asociados en la ganancia de función de alelos en desequilibrio de ligamiento con el locus promotor, es decir hay alelos de mitigación; se ha reportado

que el alelo G 1405 tiene una ganancia de función capaz de suprimir la pérdida de la función de la variante C de 1513 y de 1729^{47,49}.

Utilizando todas las muestras, el grupo de tuberculosis presentó en el genotipo AA una relación de riesgo al desarrollo de esta enfermedad. Este riesgo de reactivación de TB al presentar el genotipo AA se corroboró durante el estudio con las muestras positivas a *IS6110*. También durante la revisión de genotipos dividido por tipo de tuberculosis, se obtuvo una relación de riesgo el presentar el genotipo AA en tuberculosis pulmonar.

Nuestros resultados son opuestos a lo encontrado por Bernadette M. Saunders, et al (2003), quienes reportaron que en los macrófagos infectados con micobacterias que poseen el alelo silvestre A de 1513 hay aumento en la apoptosis y se asoció con una reducción del 90% en la carga de micobacterias y la presencia de alelo C representa pérdida de función⁵⁰.

También se ha descrito que la herencia del alelo C significa pérdida de función de P2X7 y que confiere un aumento de 3,5 veces mayor riesgo de reactivación de la tuberculosis extrapulmonar en dos grupos del sureste de Australia provenientes de Asia⁴¹, ellos coinciden con lo encontrado en el estudio, de Igor Mokrousov, et al. (2008) en que reveló que la OR global para el alelo 1513C como factor de riesgo fue de 1.81 con un modelo dominante y 2.06 bajo un modelo recesivo para tuberculosis pulmonar³⁹, al igual que un estudio realizado en México ha confirmado 1513 C como factor de susceptibilidad para la reactivación de la tuberculosis pulmonar²³.

Aunque nuestros datos contrastan a lo ya reportado podrían justificarse bajo el siguiente escenario para la tuberculosis: la micobacteria al encontrarse con un ambiente hostil en los pulmones debido a la presencia del tejido asociado a mucosas (MALT) y macrófagos alveolares, migra por torrente sanguíneo a la aorta, sitio muy oxigenado. En la capa íntima de una arteria como la aorta casi no hay presencia de macrófagos, entonces la micobacteria se reproduce, posteriormente los macrófagos son atraídos por quimiotaxis.

Una vez en el sitio de infección, los macrófagos que expresan el genotipo AA del polimorfismo 1513 en el receptor P2X7 exacerban la función de este

receptor provocando la liberación de IL-1, IL-12 y TNF- α que amplifican el proceso inflamatorio. Además los macrófagos presentan antígenos para las células T, estimulando células T autoreactivas provocando el daño vascular¹⁵.

Esta posible actividad exacerbada del receptor P2X7, al expresar el genotipo AA de su polimorfismo 1513, justificaría el riesgo encontrado en este genotipo a padecer aterosclerosis una enfermedad inflamatoria, que se encontró al evaluar todas las muestras para este grupo y al evaluar sólo las positivas a *IS6110*.

Además se encontró relación del genotipo AA entre el grupo de Takayasu y el grupo control. La justificación de esta asociación es que en ambas enfermedades, la inflamación es de tipo crónica, en aterosclerosis las células principales son las células espumosas (macrófagos llenos de lípidos) y linfocitos T en especial CD8+, en tanto la arteritis de Takayasu se caracteriza por la presencia de células T (CD4+ y CD8+).

Relación del polimorfismo -762 T/C y los grupos de estudio.

El gen *P2X7* es altamente polimórfico, y los polimorfismos en el promotor o región de codificación pueden modificar su nivel de expresión o función. Un polimorfismo en la región promotora, tal como -762 T / C, podría afectar el nivel de expresión de *P2X7* mediante la alteración de la unión de un factor de transcripción⁵¹.

En la evaluación interna de genotipos de cada grupo, tanto el grupo de Takayasu como el de tuberculosis, presentaron una asociación de riesgo al presentar el genotipo TT. La expresión de este gen relacionado con la arteritis de Takayasu o con la aterosclerosis no sea reportado, pero la asociación de riesgo en el genotipo TT coincide con el trabajo de G. Bahari et al. (2013) que encontró que el alelo T es un factor de riesgo de Tuberculosis pulmonar (PTB) en una población de Iran, De manera controversial, Singla et al. (2012) y Li et al. (2002) reportaron una asociación protectora significativa entre la TB y el alelo -762 C⁵¹. Igualmente en otro estudio realizado en la población Gámbense obtuvieron como resultado para -762, que el alelo C parece estar asociado con un efecto protector contra la tuberculosis, aunque no mostró una significancia estadística con la enfermedad³¹.

En otros reportes, Sambasivan et al. (2010) encontró una diferencia significativa entre los pacientes y los controles PTB para el alelo C e informó que el alelo C es factor de riesgo en PTB en la población india asiática. Mientras que en el estudio de Mokrousov et al. (2008) para los alelos en la posición -762, no mostró significancia estadística ($p=0.3$ en ambos alelos) con la infección tuberculosa pulmonar³⁹, de igual manera, no se encontró asociación de este polimorfismo del gen *P2X7* con TB, en el estudio de Jing Xiao, et al (2010).

La susceptibilidad del huésped a la tuberculosis es probable que este bajo control poligénico, de modo que un haplotipo susceptible pueda requerir la expresión de varios polimorfismos de genes para el desarrollo de la tuberculosis. Esto se ve apoyado con otra investigación donde se encontró que el alelo T de este polimorfismo se ha ligado al polimorfismo A1405C, esta asociación se ha vinculado a la protección de dar positiva la baciloscopia, prueba para la enfermedad tuberculosa, debido a la alta actividad de los poros podría predecir una alta relación de TNF- IL-10 con un balance conocido para conferir una ventaja en la muerte de las micobacterias y la clamidia⁴⁷.

Frecuencias alélicas de los SNP's del gen *P2X7* en otras poblaciones con tuberculosis.

El impacto general de SNPs en la susceptibilidad a la tuberculosis en una población depende de la frecuencia de los alelos de un gen en una población estudiada. La frecuencia acumulada de los polimorfismos del gen *P2X7* puede ser suficiente para influir en la susceptibilidad a la tuberculosis clínica en una población en particular. Enfatizando lo anterior se encontró por ejemplo, un riesgo aditivo a desarrollar tuberculosis pulmonar fue identificado en un SNP del gen *NRAMP1* en una población de Gambia, pero no hay esa susceptibilidad en un estudio de ligamiento en Brasil²⁷.

Sin embargo, la susceptibilidad genética a la tuberculosis, es probable que sea de naturaleza poligénica, en la que el equilibrio entre los efectos de los genes de susceptibilidad y de protección, pueden actuar en conjunto con los factores ambientales para determinar el riesgo de enfermedad activa.

En las frecuencias alélicas de las diferentes poblaciones consultadas se puede observar que en los controles sanos la expresión del alelo A del polimorfismo 1513A/C es mayor comparando con los sujetos tuberculosos, mientras que el alelo C muestra una tendencia inversa; exceptuando los datos de la población asiática australiana y los datos de este estudio con tendencia inversa. En tanto el SNP -762T/C el alelo silvestre T tiene frecuencias altas en pacientes con tuberculosis y disminuye en pacientes sanos, que tienen la misma tendencia que los resultados de este trabajo.

Se ha sugerido que el efecto(s) de este gen puede ser el resultado de otros factores no genéticos o, alternativamente, de los factores genéticos no ligados. En el caso en particular de la población gámbense se descarta la influencia del polimorfismo 1513A/C y consideró poco probable que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con mutación, debido a que este último no se presenta normalmente en las cohortes de Gambia (Li Cheux M, et al, 2002)³¹.

También se ha reportado que aunque el efecto de la población del genotipo CC -762 puede ser comparable en la magnitud con otros polimorfismos (VDR TT y NRAMP1 GC) asociados con TB que han sido previamente reportados, la gran mayoría de la variación en la susceptibilidad a la tuberculosis sigue siendo inexplicable³¹.

Conclusión:

El presente trabajo evaluó la influencia de los polimorfismos 762T/C y A1513C del gen *P2X7* en arteritis de Takayasu y la Tuberculosis, enfermedades diferentes pero que se unen a través de las funciones que desempeña el receptor *P2X7* como los son mecanismos proinflamatorios y los mecanismos ligados a la muerte de patógenos intracelulares.

En este trabajo se encontró relación del genotipo AA del polimorfismo 1513 con la arteritis de Takayasu y la Tuberculosis, en ambos los casos el genotipo AA representó una frecuencia mayor a la del grupo control. Aunque los resultados reportados informan que el genotipo AA represente protección, se propone que el genotipo AA exagera la respuesta inflamatoria provocando daño vascular, que caracteriza a las lesiones encontradas en estas enfermedades.

Para el polimorfismo -762 el genotipo TT tuvo una frecuencia mayor a la del control para los grupos de arteritis de Takayasu y tuberculosis, estos resultados podrían estar asociados a riesgo de padecer estas enfermedades, esta posibilidad se encuentra polarizada en cuanto a lo reportado anteriormente, pues algunos apoyan nuestros resultados y otros los contradicen.

El gen *P2X7* resultó estar asociado por medio de su polimorfismo 1513A/C (genotipo AA; AA vs AC+CC, OR = 2.6) a la tuberculosis pulmonar, en donde se destaca la actividad para matar bacterias intracelulares, producto de un proceso inflamatorio.

Al encontrarse asociación entre los polimorfismos del gen *P2X7* y la arteritis de Takayasu se puede decir que este gen tiene influencia en el desarrollo de esta enfermedad, también en este trabajo se encontró asociación de tuberculosis con este gen, sin encontrar asociación entre las dos enfermedades (al evaluar las muestras de Takayasu positivas a *IS6110*), por esto se deben realizar más estudios para corroborar esta situación, ya que este estudio es el primero en relacionar este gen con la enfermedad de Takayasu y con la tuberculosis.

Bibliografía.

1. Dufrechou C, Cedrés S, Robaina R, Bagattini J.C. *Arteritis de Takayasu: Revisión de criterios diagnósticos y terapéuticos a propósito de un caso clínico*. Revista Médica del Uruguay, 2006; 22: 236-240.
2. Numano F, Kobayashi Y, *Takayasu Arteritis*, Internal Medicine, 2002; 41: 44-46.
3. Johnston S.L, Lock R J, Gompels MM, *Takayasu arteritis: a review*, Journal of Clinical Pathology, 2002; 55:481-486.
4. Numano F., *The story of Takayasu arteritis*, Rheumatology, 2002; 21:103-104.
5. Tann Oliver R, Tulloh Robert M.R, Hamilton Mark C.K., *Takayasu's disease: a review*, Cardiology in the Young 2008; 18: 250–259
6. Eijun S, Ichiro S, Masataka U, *MRI of Takayasu's Arteritis: Typical Appearances and Complications*, American Journal of Roentgenology, 2006; 187: W569-W575.
7. García Camacho L, Olea Comas I, Talegón Meléndez A. y Castell Monsalve J., *Diagnóstico de la arteritis de Takayasu mediante técnicas no invasivas*. Radiología. 2009; 51:287–293.
8. Mendiola Ramírez K, Portillo Rivera A. C, Galicia Reyes A, García Montes J. A, Maldonado Velázquez M. R. y Faugier Fuentes E, *Arteritis de Takayasu tipo III en un paciente pediátrico*. Reporte de caso y revisión de la literatura. Reumatología clínica, 2012; 8:21-219.
9. Godoy F, Urbina I, *Arteritis de Takayasu en el Hospital Escuela, Tegucigalpa.*, Revista Médica de Honduras 2000; 68: 149-152.
10. Ochoa C. D. *Epidemiología de las vasculitis primarias en Colombia y su relación con lo informado para Latinoamérica.*, Revista colombiana de reumatología, 2009; 16: 248-263.
11. Hahn D, Thomson P, Kala U, Beale P, Levin S, *A review of Takayasu's arteritis in children in Gauteng, South Africa*, Pediatric Nephrology. 1998; 12: 668-675.
12. Barrios F. R., Carvajal R. L., Mora T.A., Rodríguez H.R., Zarco R.J., Luna E. M., Reynes M. J.N., Juárez N.F., Reyes G. U., *Arteritis de Takayasu. Reporte de dos casos*. Revista Mexicana de Pediatría, 2004; 71:17-21.

13. Lupi-Herrera E, et al., *Takayasu arteritis*. Clinical study of 107 cases. *Am Heart J* 1997; 93:94-103.
14. Fuller S. J., Stokes L, Skarratt K. K., Gu Ben J., Wiley J, *Genetics of the p2x7 receptor and human disease*, *Purigenic Signalling* 2009 5:257-262.
15. H. A.M. Nazmul Ahasan, Billal Alam, Monzurul Hasan Chowdhury, Fazle Rabbi Mahammed, Zannatun Nur., *Takayasu's Arteritis in Association with Tuberculosis in Young Woman*, *Pak Journal Science*, 2009; 25:1009-1011.
16. Berrington W. R., Hawn T. R., *Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?* *Immunology Review*, 2007; 219: 167-186.
17. Estadísticas Sanitarias Mundiales 2009, Organización Mundial de la Salud de. www.who.int/whosis/whostat/ES_WHS09_F.
18. Castellanos Joya M, García Avilés M. A, Téllez Medina H, *Epidemiología, sistema Nacional de vigilancia Epidemiológica (SINAVE)*. 2008; 13:1-3.
19. García Cruz A. E., *Boletín de Práctica Médica Efectiva: Tuberculosis pulmonar Diagnóstico y tratamiento*. Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
20. Ulrichs T. y Kaufmann S, *New insights into the function of granulomas in human tuberculosis*, *Journal of Pathology*, 2006; 208: 261-264.
21. Cosma C. L., Sherman D. R, Ramakrishnan L. *The secret lives of the pathogenic mycobacteria*. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57:641–676.
22. North A.R., *Molecular physiology of P2X receptors*, *Physiological Reviews.*, 2002; 82: 1013-1067.
23. Niño Moreno P, Portales Pérez D, Hernández Castro B, Portales Cervantes L., et al, *P2X7 and NARAMP1/SLC11A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007, 148: 469-477.
24. Coutinho-Silva Robson, Corrêa Gladys, Sater Ali Abdul, Ojeius David M., *The P2x7 receptor and intracellular pathogens*, *Purinergic Signalling*, 2009, 5:197-204.
25. Dubyak George R., *Go it alone no more P2X7 joins the society of heteromeric ATP-Gated receptor channels.*, *Molecular Pharmacology*, 2007, 72: 1402-1405.

26. Gu Ben J., Rathsam C, Stokes L, MvGeachle A, Wiley J, *Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X7 pore formation.*, American Journal Physiology Cellular Physiology, 2009; 297: 430-439.
27. Suran L. Fernando, et al. *Gene Dosage Determines the negative effects of polymorphic alleles of the P2X7 receptor on adenosine triphosphate-mediated killing of mycobacteria by human macrophages.* The Journal of Infectious Diseases. 2005; 192: 149-155.
28. DL Donnelly-Roberts and MF Jarvis. *Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states.* British Journal of pharmacology, 2007; 151:571-579.
29. Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, DiVirgilio F, Feraari D, *P2X7 receptor: Death or life?*, Purinergic Signalling, 2005; 1: 219-227
30. Ben J. Gu, et al. *A Glu-496 Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor.* The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276: 11135-11142.
31. Li Cheuk M., et al. *Association of a Polymorphism in the P2X7 gene with Tuberculosis in a Gambian Population*, The Journal of Infectious Diseases, 2002; 186: 1458-1462.
32. Hata et al, *angiographic findings of Takayasu arteritis new classification*, *Int J Cardiol.* 1997; 54:156-163
33. Negi SS, R Anand, ST Pasha, et al., *Diagnostic potential of IS6110, 38 KDA, 65KDA and 85B sequencebased polymerase chain reaction in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples.* Indian Journal of Medical Microbiology, 2007; 25: 43-49.
34. Agapito J, Neyra V, et al, *Caracterización de las mutaciones en el gen rpoB asociadas a la resistencia Rifampicina y tipificación molecular mediante RFLP (IS6110) en cepas de M. tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar.* Enfermedades del tórax, 2003; 46:9-24.
35. Retamal P, Martínez A, *Secuencias de inserción IS6110 en cepas de Mycobacterium bovis provenientes de bovinos beneficiados en la región Metropolitana*, Revista chilena de Infectología 2003; 20:166-170.
36. Negi SS et al. *Diagnostic potential of IS6110, 38KDA, 65KDA and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of*

- Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. Indian Journal of Medical Microbiology. 2007; 25: 43-49.
37. Fernando Suran, et al, *A polymorphisms in the p2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary Tuberculosis*, Am J Respir Crit care Med, 2007; 175: 360-366.
38. Mokrousov I. et al, *Mycobacterium tuberculosis co-existence with humans: marking an imprint on the macrophage P2X7 receptor gene?* Journal of Medical Microbiology, 2008; 57: 581-584.
39. Jing Xiao, et al, *Metaanalysis of P2X7 gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility*, FEMS Immunology Medical and Microbiology, 2010; 60: 165-170.
40. Xiao Jing et al, *Lack of association between polymorphisms in the P2X7 gene and tuberculosis in a Chinese Han population*, FEMS Immunology medical and Microbiology, 2009; 55: 107-111.
41. Ben-Selma W, Ben-Kanla I, Boukadida J, Harizi H, *Contribution of p2x7 1513A/C loss-of-function polymorphism to extrapulmonary tuberculosis susceptibility in Tusian populations, articulo aceptado en FEMS Immunology & Medical Microbiology.*
42. Albizzati J. et al, *Arteritis de Takayasu: valoración de los métodos de diagnóstico por imágenes a propósito de un caso.* Revista argentina de cardiología. 2005; 73: 145-148.
43. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>, revisada el 11 de junio de 2013.
44. Bournon-Cuellar RA, López- M. *Atherosclerosis y lesión endotelial: ¿proceso irreversible?* Med Int Mex 2010; 26:590-596.
45. Kothari SS. *Takayasu's arteritis in children – a review.* Images Paediatr Cardiol, 2002; 9:4-23.
46. Serratrice, J., Benyamine, A., Vidal, V., Talet, H. B., Amri, A. B., Ene, N., Serratrice, C. R. & Weiller, P. J. *Simultaneous occurrence of diffuse Takayasu's arteritis and severe disseminated tuberculosis.* Rev Med Interne 2008; 29: 520-523.
47. Denlinger L, et al., *Human P2X7 pore function predicts allele linkage disequilibrium.* Clinical Chemistry, 2006; 52:995-1004

48. Portales-Cervantes, L., Nino-Moreno, P., Doniz-Padilla, L., Baranda-Candido, L., Garcia-Hernandez, M., Salgado-Bustamante, M., Gonzalez-Amaro, R. & Portales-Perez D. *Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Hum Immunol 2010; 71: 818-825.
49. Seko Y, *Takayasu Arteritis: Insights into immunopathology*, Japan Heart Journal, 2000; 41: 15-25.
50. Saunders B. M, Suran L. F, et al, *A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-Mediated Killing of mycobacteria*. The Journal of Immunology. 2003; 171: 5442-5446
51. G. Bahari et al. *Association of P2X7 gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran*. Genetics and Molecular Research, 2013; 12: 10-166.

Anexo 1

EXTRACCION DE ADN DE TEJIDOS FIJADOS EN PARAFINA TECNICA DE NUCLEON (illustra Nucleon Genomic, GE Healthcare)

Material

Etanol 70% frío

Etanol absoluto frío

Xyleno

Cloroformo

Reactivo B (asegurarse que éste completamente disuelto, puede ocuparse calor suave)

TÉCNICA

1. Tomar una sección de 20-30 micras de tejido y ponerla en un tubo de microcentrifuga de 1.5mL.
2. Cubrir el segmento en xileno. Incubar a 37° por 20 minutos. Centrifugar a 1300g (7500 rpm) 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 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 350µL de reactivo B.
6. Añadir 18µL de la solución a proteinasa K+lisosima. Incubar a 55 °C toda la noche.

DESPROTEINIZACION

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 ADN

8. Añadir 600 μ L de cloroformo. Mezclar invirtiendo el tubo al menos 7 veces.
9. Añadir 150 μ L de la resina Nucleon y sin mezclas las fases centrifugar a 350g (2000 rpm) por 1 minuto.

PRECIPITACIÓN DEL ADN

10. Sin remover la capa de la resina de Nucelon (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 evitarse. Si se ha tomado un poco de la resina centrifugar 1 minuto a 1300 g (7500 rpm) 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 ADN.

LAVADO DEL ADN

12. Centrifugar a máxima velocidad por 15 minutos el pellet de ADN. Descartar el sobrenadante.
13. Añadir 1mL 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 ADN en un volumen apropiada de agua o en solución amortiguadora de TE (ej. 100 μ L).

Anexo 2

Procedimiento para ajustar la concentración del ADN.

$$(Abs_{260nm}) \times (50 \text{ ng}) \times (100 \mu\text{L}^{-1}) = \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times (\text{Vol. total del tubo}) = \text{ng}_{\text{totales en el tubo}}$$

Para ajustar a 200ng/ μL dividir los ng totales entre 200 y al resultante restarle el volumen total del tubo eppendorf y ese valor es el que hay que agregar de agua al tubo para ajustar la concentración de ADN a 200ng/ μL .

UDO: unidad de densidad óptica a 20nm= 50ngX 100 μL (vol. De dilución).

Ejemplo:

$$Abs_{260nm} (0.0565) \times 50\text{ng} \times 100 (\text{factor de dilución}) = 282.5\text{ng}/\mu\text{L}.$$

$$282.5\text{ng} \times 90\mu\text{L} (\text{Vol. del tubo}) = 25425\text{ng en } 90\mu\text{L} (\text{concentración total})$$

$$25425/200 (\text{concentración deseada}) = 127.125\text{mL} - 90\text{mL} (\text{volumen en tubo}) = 37.125\mu\text{L} (\text{volumen a agregar para ajustar a } 200 \text{ gm}/\mu\text{L}).$$

Anexo 3

Reactivos para amplificación de ADN por PCR.

En el tubo matriz se coloca la mezcla de reacción para, posteriormente distribuir en los microtubos para PCR.

Cantidades utilizadas para la amplificación por PCR

Reactivos:	Volumen 25µL
Mezcla de dNTP [1.25mM]	4µL
Amortiguador libre de Mg [10X]	2.5 µL
MgCl ₂ [25mM]	1.5 µL
Iniciador 1 [10 µM]	2.5 µL
Iniciador 2 [10 µM]	2.5 µL
Taq polimerasa	0.125 µL
Agua	9.4 µL
DNA [200ng/ µL]	2.5 µL

Anexo 4

Gel de acrilamida al 8%, su preparación y condiciones de la corrida de electroforesis.

Soluciones	Cámara de 10x10
Agua	4.6mL
Acrilamida	2.6mL
Amortiguador TBE(Tris-borato EDTA) 10X	0.8mL
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)	16 µL
Persulfato de amonio 10%	64 µL

La tabla anterior muestra los reactivos para la preparación del gel de acrilamida al 8%. Antes de comenzar a su elaboración se debe cuidar la limpieza de los vidrios de la cámara, para eso se lavan los vidrios con dextran, verificar que se encuentren desengrasados (si es necesario limpiarlos con etanol).

Después se montan los vidrios a la cámara, asegurándose de que este limpia y que no presente fugas.

Se prepara el gel con las cantidades de las soluciones mencionadas en la tabla anterior, agregando hasta el final el TEMED y el persulfato de amonio (agentes polimerizantes). Se verte el gel de manera rápida y cuidadosa a la cámara para evitar la presencia de burbujas y la solidificación del gel antes de tiempo. Colocar los peines inmediatamente antes de que polimerice. Esperar que polimericé, agregar la solución de amortiguador de siembra para electroforesis a la cámara, finalmente cargar las muestras de DNA. Correr a 80 V por 2.5 horas.

Anexo 5

Tinción de plata para gel de acrilamida al 8%

Reactivos:

SOLUCION FIJADORA	
ETANOL AL 10%	30mL
ÁCIDO ACEÉTICO AL 0.5%	1.5mL
AGUA	300mL

SOLUCION DE REVELADO	
HIDROXIDO DE SODIO AL 30%	3g
FORMALDEHIDO AL 37%	300 μ L
SOLUCION DE FIJADORA	100mL

SOLUCION DE REVELADO	
SOL. DE NITRATO DE PLATA AL 2%	
NITRATO DE PLATA	200mg
SOLUCION FIJADORA	100mL

SOLUCION DE PARO	
ÁCIDO ACETICO GLACIAL AL 1.5%	1.5mL
SOLUCION DE FIJADORA	100mL

1. Se toman precauciones para realizar esta tinción, se utilizan guantes para la protección debido a que la acrilamida es neurotóxica.
2. Inmediatamente después de retirar el gel de la cámara donde se realizó la corrida electroforética, colóquelo en un recipiente con aproximadamente 200 mL de solución fijadora por 30 min con agitación suave. Quitar la solución fijadora y enjuagar con agua destilada.
3. Incubar con aproximadamente 100mL de solución de tinción por 15 min con agitación suave, después enjuagar con agua destilada.
4. Incubar con \approx 100mL solución reveladora durante 10 min o hasta que se revele las bandas en el gel.
5. Para la reacción inmediatamente después de visualizar las bandas que se esperan con la solución de paro.
6. Secar en marcos de acrílico y papel celofán, para su conservación.