

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**“CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE
PROGRESIÓN A TUBERCULOSIS PULMONAR EN PACIENTES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:
**DOCTOR EN CIENCIAS EN
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA:

M. en C. Benjamín Gándara Jasso

Directores de tesis:

Dr. José A. Enciso Moreno (UIMZ, IMSS-Zacatecas)

Dr. Jorge A. González y Merchand (ENCB-IPN)

México, D. F. Julio 2009

El presente trabajo se realizó casi en su totalidad en la Unidad de Investigación Médica del IMSS en Zacatecas y en parte en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José Antonio Enciso Moreno y del Dr. Jorge Alberto González y Merchand.

El sustentante agradece la beca otorgada por el CONACYT a través del Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología Molecular de la ENCB del IPN y la beca complementaria otorgada por la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS. De igual forma, se agradece la beca-tesis otorgada por el IPN.

El presente trabajo de tesis formó parte de varios proyectos realizados gracias al financiamiento de: Fondos Sectoriales CONACYT-IMSS-ISSTE-SSA (registro 14444), del Instituto Científico Pfizer (FP 399) y por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social a través del Fondo para el Fomento de la Investigación (FP 095), Instituciones a las que se agradece este apoyo. En todos estos proyectos el responsable fue el Dr. José Antonio Enciso Moreno.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis: al Dr. José Antonio Enciso Moreno, jefe de la Unidad de Investigación Médica del IMSS en Zacatecas y al Dr. Jorge Alberto González y Merchand, jefe del Laboratorio de Microbiología Molecular de la ENCB/IPN, por brindarme la oportunidad de entrar en su mundo apasionante de la Ciencia. Gracias por su confianza, amistad y ayuda.

A mis sinodales: Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez, Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández, Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García y Dra. Rosa María Ribas Jaimes. Mil gracias por sus valiosas aportaciones al presente trabajo de tesis.

Al personal y estudiantes de la Unidad de Investigación Médica del IMSS en Zacatecas, por brindarme siempre su amistad y apoyo.

A los Investigadores: Dra. Carmen Judith Serrano Escobedo, Dr. Bruno T. Rivas Santiago y Dr. Juan Raymundo Velázquez Rodríguez. Gracias por su orientación y amistad.

A Ema Valenzuela Méndez, Leonor Enciso Moreno, Yolanda García de Lira y María Eugenia López Bernal, quienes fueron parte fundamental en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos por siempre: Susana Godina González, Vania Colmenares De la Torre y Julio Castañeda Delgado.

A Noé Macías Segura, por su siempre valiosa ayuda para la realización del presente trabajo y, sobre todo, por su amistad sincera. Gracias por permitirme ser tu amigo.

Al personal y estudiantes del Laboratorio de Microbiología Molecular de la ENCB/IPN.

Al Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés, Dra. Sandra Rivera Gutiérrez, Dra. Addy Cecilia Helguera Repetto y Patricia Velázquez. Gracias por su ayuda y amistad.

DEDICATORIA

A mis padres:

- A mi cariñoso y entrañable padre Benjamín Gándara Huizar, quien siempre está en mis pensamientos y en mi corazón. En donde quiera que esté...
- A mi maravillosa y queridísima madre Juana Jasso Rodríguez, a quien le debo lo que soy.

A mis queridos hermanos y hermanas:

- Bertha, Raymundo, Javier, Juan, Jorge, Angélica, Paz, Lety y Sergio.

A mi amada familia:

- A Soniushka, por darme la fuerza y el amor para lograr este importante objetivo profesional y de vida. Con todo mi amor.
- A mis amadísimos hijos, Escarleth Larisa y Abner Benjamín, quienes son un regalo divino.
- A Memo y Viry, quienes son parte muy importante en mi vida.

A unas personas muy especiales:

- A Socorro Manzanero (Soco): una mujer única. Le estaré eternamente agradecido por su amistad, apoyo y ternura.
- A Jaime y Miguel, mis hermanos adoptivos.

A mis amigos por siempre:

- Aracely Contreras Rodríguez, Lorena López Ordoñez y Rogelio Guajardo Trinidad. Gracias por permitirme ser parte de sus vidas. Siempre los consideraré mis amigos y mis hermanos.

A Dios por darme tanto sin merecerlo.

CONTENIDO	Página
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
I. ANTECEDENTES.....	1
I.1. Asociación de la diabetes mellitus y la tuberculosis.....	1
I.2. Estudios epidemiológicos de la DM2 en México y en la población hispana de los Estados Unidos de Norte América.....	2
I.3. La patogénesis y la respuesta inmune en la diabetes mellitus tipo 2.....	3
I.4. La respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar.....	4
I.5. El diagnóstico de la tuberculosis latente.....	6
I.6. El uso de microarreglos de DNA para el estudio de la relación huésped-patógeno.....	7
I.7. El perfil de expresión genética y su uso como “huella digital transcripcional” en diversas patologías.....	8
I.8. Identificación de marcadores moleculares de desarrollo a tuberculosis pulmonar activa en un modelo de ratón.....	9
II. JUSTIFICACIÓN.....	11
III. HIPÓTESIS.....	12
IV. OBJETIVOS.....	13
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
V.1. Identificación, mediante bioinformática, de los genes de humano que presentan homología con los genes asociados con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo experimental de ratón.....	16
V.2. Diseño y construcción del microarreglo de expresión CustomArray 4X2K de CombiMatrix.....	17
V.3. Reclutamiento de los individuos y obtención del material biológico.....	18
V.3.1. Reclutamiento de individuos.....	18
V.3.2. Estratificación de los individuos.....	18
V.3.3. Criterios de selección de los individuos.....	19
V.3.4. Obtención del material biológico.....	21
V.3.5. Recolección, estabilización, y conservación de las muestras sanguíneas.....	22
V.4. Extracción del RNA total.....	22
V.5. Concentración y enriquecimiento del RNA.....	23
V.6. Eliminación de transcritos de globina.....	23
V.7. Amplificación y marcaje de RNA libre de transcritos de globina.....	24
V.8. Fragmentación del cRNA-biotina.....	24
V.9. Hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k de CombiMatrix.....	26
V.9.1. Determinación de la sensibilidad de hibridación del microarreglo.....	26
V.9.2. Prehibridación.....	27
V.9.3. Hibridación.....	27
V.9.4. Lavados y marcaje posthibridación.....	27
V.10. Lectura de los microarreglos CustomArray 4x2k de CombiMatrix.....	28
V.11. Análisis de la imagen resultante y extracción de los datos de hibridación.....	28
V.12. Análisis de los datos obtenidos por microarreglos.....	28

V.13. Validación de los resultados obtenidos por microarreglos mediante PCR en tiempo real.....	30
V.13.1. Determinación del gen constitutivo de referencia.....	31
V.13.2. Diseño y síntesis de iniciadores.....	31
V.13.3. Purificación de iniciadores.....	32
V.13.4. Síntesis de cDNA.....	32
V.13.5. Rango dinámico.....	32
V.13.6. Ensayos de amplificación.....	33
V.13.7. Cálculo de la expresión relativa de los genes analizados.....	34
V.13.8. Determinación del poder discriminante de los genes identificados por microarreglos y analizados por RT-PCR en tiempo real.....	36
V.13.9. Cálculo de la sensibilidad y especificidad de los genes.....	36
V.13.10. Prueba de Mann-Whitney para el análisis estadístico de los datos de expresión.....	37
VI. RESULTADOS.....	38
VI.1. Genes de humano homólogos a los genes asociados con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo experimental de ratón.....	38
VI.2. Características del microarreglo de expresión CustomArray 4X2K “UIMZ-IMSS-MX”.....	38
VI.3. Reclutamiento de los individuos y obtención del material biológico.....	41
VI.4. RNA total.....	44
VI.5. Análisis electroforético del RNA total extraído a partir de muestras de sangre total de individuos de diferentes subgrupos clínicos.	44
VI.6. Concentración y enriquecimiento de muestras de RNA	46
VI.7. Eliminación de transcritos de globina.....	46
VI.8. Amplificación y marcaje del RNA.....	47
VI.9. Condiciones experimentales generales para realizar los estudios de microarreglos de expresión, establecidas con base en los procedimientos estandarizados.....	48
VI.10. Fragmentación del cRNA-biotina.....	53
VI.11. Hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k de CombiMatrix.....	54
VI.12. Lectura de los microarreglos	55
VI.13. Análisis de la imagen resultante y extracción de los datos de hibridación.....	58
VI.14 Análisis de los datos obtenidos por microarreglos.....	60
VI.14.1. Genes diferencialmente expresados.....	60
VI.14.1.i. Gráficas de SAM.....	60
VI.14.1.ii. Análisis de la agrupación jerárquica de genes.....	62
VI.14.2. Lista de genes sobreexpresados con significancia estadística en los subgrupos de pacientes NO DM2/TBPA y DM2/TBPA generados por SAM.....	68
VI.15. Ensayos de RT-PCR en tiempo real.....	75
VI.15.1. Determinación del gene constitutivo de referencia.....	76
VI.15.2. Sondas e iniciadores usados en la amplificación de los genes problema.....	76
VI.15.3. Concentración de las muestras de cDNA sintetizadas a partir de RNA libre de transcritos de globina.....	77
VI.15.4. Rango dinámico.....	79
VI.15.5. Datos de la expresión relativa.....	80

VI.16. Determinación del poder discriminante, entre pacientes con TBLT y TBPA en individuos con y sin DM2, de los genes identificados por microarreglos y analizados por RT-PCR en tiempo real.....	83
VI.16.1. Cálculo de la sensibilidad y especificidad y de la significancia estadística de los 10 genes analizados.....	83
VI.16.2. Identificación de los mejores genes discriminantes entre pacientes TBLT y TBPA en los grupos de pacientes NO DM2 y DM2.....	84
VI.16.3. Utilización de los genes HP, ITGB2 y CD14 como marcadores de progresión de TBLT a TBPA en pacientes con DM2.....	89
VI.16.4. Identificación de un caso clínico probable de progresión de TBLT a TBPA en un paciente con DM2.....	89
VI.16.5. Identificación de un caso clínico confirmado de progresión de TBLT a TBPA en un paciente con DM2.....	92
VI.16.5.i. Paciente en la fase latente de la infección en progresión hacia la fase activa.....	92
VI.16.5.ii. Paciente en la fase activa de la infección.....	93
VI.16.5.iii. Paciente en la fase de post-tratamiento con antifímicos.....	93
VII. DISCUSIÓN.....	96
VIII. CONCLUSIONES.....	105
IX. PERSPECTIVAS.....	106
X. REFERENCIAS.....	107
XI. APÉNDICE.....	115

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1	Estrategia general de trabajo.....	16
Figura 2	Grupos y subgrupos clínicos que integran los diferentes individuos con base en los resultados de los criterios de selección.....	21
Figura 3	Características del microarreglo CustomArray 4X2K de CombiMatrix "UIMZ-IMSS-MX".....	40
Figura 4	Electroferograma del RNA total extraído a partir muestras de sangre completa de 7 individuos de diferentes subgrupos clínicos.....	45
Figura 5	Electroferograma del RNA libre de transcritos de globina	47
Figura 6	Condiciones experimentales generales para realizar los estudios de microarreglos de expresión, establecidas con base en los procedimientos estandarizados.....	49
Figura 7	Electroferograma de muestras de cRNA-biotina no fragmentadas y fragmentadas provenientes de seis individuos representativos de los 6 subgrupos clínicos.....	54
Figura 8	Imagen digitalizada de los resultados de hibridación de muestras de cRNA-globina/spikes a un microarreglo 4x2k de CombiMatrix.....	60
Figura 9	Gráfica de distribución de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes NO DM2/TBPA con respecto al grupo NO DM2/TBTL.....	61
Figura 10	Gráfica de distribución de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con DM2/TBPA con respecto al grupo DM2/TBTL.....	62
Figura 11	Agrupación jerárquica de los genes diferencialmente expresados en TBTL y TBPA en pacientes NO DM2.....	64
Figura 12	Agrupación jerárquica de los genes diferencialmente expresados en TBTL y TBPA en pacientes con DM2.....	67
Figura 13	Distribución de pacientes de los subgrupos clínicos DM2/TBTL y DM2/TBPA observada en los 3 genes con más alto poder discriminante, basada en los niveles de expresión relativa obtenidos por RT-PCR tiempo real.....	88
Figura 14	Comportamiento de los 3 genes candidato de progresión a TBPA en un paciente con DM2/TBTL en estado sugerente de progresión a TBPA.....	91
Figura 15	Comportamiento de los 3 genes candidato de progresión a TBPA en un paciente con DM2/TBTL que reactivó a TBPA.....	94

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
Tabla 1	Estratificación de individuos.....	19
Tabla 2	Reactivos y volúmenes requeridos para la fragmentación del cRNA-biotina, para hibridar 1 sector del microarreglo CustomArray 4x2k de CombiMatrix.....	26
Tabla 3	Mezcla de reacción para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.....	34
Tabla 4	Programa de amplificación del termociclador LightCycler 2.0.....	34
Tabla 5	Características generales de los individuos que integran el estudio.....	42
Tabla 6	Rendimiento del RNA total, del RNA concentrado y enriquecido, del RNA libre de transcritos de globina y del cRNA-biotina, de los 60 individuos pertenecientes a los 6 subgrupos clínicos.....	51
Tabla 7	Muestras de aRNA-biotina hibridadas a los microarreglos CustomArray 4x2k.....	56
Tabla 8	Datos generales de los experimentos de hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k las muestras de aRNA-biotina provenientes de los 12 individuos de los subgrupos clínicos NO DM2/TBLT y NO DM2/TBPA.....	57
Tabla 9	Datos generales de los experimentos de hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k de las muestras de aRNA-biotina provenientes de los 12 individuos de los subgrupos clínicos DM2/TBLT y DM2/TBPA.....	58
Tabla 10	Genes sobreexpresados y con significancia estadística identificados por microarreglos en los subgrupos de pacientes NO DM2/TBPA y DM2/TBPA generados por el programa SAM.....	69
Tabla 11	Función biológica de los genes sobreexpresados en ambos subgrupos de pacientes NO DM2/TBPA y DM2/TBPA identificados por microarreglos.....	75
Tabla 12	Sondas y secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación por RT-PCR en tiempo real de 10 genes identificados por microarreglos.....	77
Tabla 13	Concentración de las muestras de cDNA sintetizadas a partir de RNA libre de transcritos de globina de los 60 individuos que conforman los 6 subgrupos clínicos, para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.....	79
Tabla 14	Expresión relativa de 10 genes identificados por microarreglos en el grupo de pacientes NO DM2 determinada por RT-PCR en tiempo real.....	81
Tabla 15	Expresión relativa de 10 genes identificados por microarreglos en el grupo de paciente DM2 determinada por RT-PCR en tiempo real.....	82
Tabla 16	Cálculo de la sensibilidad y especificidad del gene HP en los 10 pacientes DM2/TBLT y 10 los pacientes DM2/TBPA.....	84
Tabla 17	Concordancia estadística entre los estudios de microarreglos y RT-PCR en tiempo real de los 3 genes identificados con mayor poder discriminante entre los subgrupos DM2/TBLT y DM2/TBPA.....	86

RESUMEN

El desarrollo de enfermedades crónico degenerativas asociadas a la vejez y a los malos hábitos alimenticios en humanos, son factores de riesgo para el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa (TBPA). Así, se ha reportado que la tuberculosis es 6.8 veces más frecuente entre pacientes con diabetes mellitus (DM2) y con tuberculosis latente (TBLT), comparado con individuos sin DM2 y con TBLT. Actualmente, la proporción de casos de tuberculosis con DM2 en el ámbito mundial varía de 1 a 9.3%. En México, se reporta que el riesgo relativo de desarrollar TBPA debido a la presencia de DM2 es del 25%. El uso de microarreglos de DNA ha permitido identificar patrones de expresión que pueden ser considerados la “huella digital transcripcional” de una célula o de un tejido en respuesta a un estímulo específico, misma que puede utilizarse como marcador molecular para el diagnóstico de ciertas enfermedades, o bien, para predecir progresión en determinadas patologías como en la TBPA. En la actualidad no existen métodos moleculares disponibles para identificar la progresión de la TBLT a TBPA en grupos de alto riesgo, incluyendo DM2. Nuestro grupo ha identificado biomarcadores asociados al desarrollo de TBPA en un modelo experimental de ratón. Considerando lo anterior, la finalidad del presente trabajo fue identificar marcadores moleculares de progresión de TBLT a TBPA en sangre completa de individuos con o sin DM2, mediante el uso de la tecnología de microarreglos de expresión. En el trabajo se usaron microarreglos diseñados para contener genes de nuestro interés en formato CustomArray 4x2k de CombiMatrix. Se obtuvo sangre de 60 individuos con y sin DM2, tanto de individuos no infectados con *M. tuberculosis* (CTRL), con tuberculosis latente (TBLT) y con tuberculosis pulmonar activa (TBPA) previamente seleccionados bajo estrictos criterios clínicos y de laboratorio. Para la recolección y conservación de sangre y para el aislamiento del RNA, se usó el sistema “PAXgene”. El cRNA biotinilado se sintetizó con el sistema MessageAmpII-Biotin *Enhanced* aRNA. Se realizó la hibridación a chips de CombiMatrix y los valores de hibridación se obtuvieron con el escáner GenePix Personal 4100A. El análisis estadístico de los resultados se hizo con el programa “SAM 1.15”. Se realizó el agrupamiento jerárquico de genes con los programas “Cluster and TreeView 1.60”. Los niveles de expresión de los genes identificados por microarreglos se corroboraron por RT-PCR en tiempo real. Se identificaron 3 genes candidato de progresión de TBLT a TBPA en pacientes con DM2: HP, ITGB2 y CD14. Estos genes son capaces de discriminar pacientes con DM2, ya sea en estado latente o en estado activo de la infección tuberculosa. Por su alto grado de sensibilidad y especificidad podrían ser usados para evaluar la eficacia del tratamiento con antifímicos en pacientes con DM2. En el estudio se identificaron dos fases de progresión de la TBLT a TBPA en el grupo de individuos con DM2. Con estos resultados se sientan las bases para el desarrollo de una prueba diagnóstica simple que permita la detección de pacientes con DM2 en proceso de reactivación de la TBLT.

ABSTRACT

Chronic degenerative diseases associated with aging and poor dietary habits of the population represent risk factors for the development of active pulmonary tuberculosis (APT_B). Particularly, tuberculosis is 6.8 times more frequent among patients with type 2 diabetes mellitus (DM₂) and latent tuberculosis (LTT_B) compared to individuals without DM₂ and with LTT_B. The proportion of APT_B cases with DM₂ varies from 1 to 9.3%. In Mexico the relative risk of developing APT_B in patients with DM₂ is 25%. The use of microarrays for the analysis of differential expression provides patterns of expression that can be considered the "transcriptional fingerprint" of a cell or a tissue in response to a specific stimulus. This fingerprinting can be used as a molecular marker for the diagnosis of certain diseases, or to predict progression of certain pathologies like APT_B. Molecular markers have been identified for development of APT_B in an experimental mouse model, although there are currently no available molecular methods to identify progression of LTT_B to APT_B in high-risk groups, including DM₂. The purpose of this study includes the identification of molecular markers of progression to APT_B in whole blood of patients with or without DM₂, using microarrays. Microarrays were designed to contain genes of interest in a CustomArray 4x2k platform. Sixty blood samples were collected from individuals with and without DM₂ including not infected (CTRL), latent tuberculosis (LTT_B), and active pulmonary tuberculosis (APT_B) individuals, which were selected under strict clinical and laboratory criterion. "PAXgene" tubes were used for the collection and preservation of blood and for isolation of RNA. The biotinylated cRNA was synthesized with the MessageAmpII-Biotin Enhanced aRNA system. Hybridizations were performed according to protocols of CombiMatrix and the values of hybridization were obtained with GenePix Personal 4100A scanner. Statistical analysis of results was carried out using SAM 1.15 software. Hierarchical clustering was performed using the programs Cluster and TreeView 1.60. Genes identified by microarray were confirmed by real-time RT-PCR. We identified 3 genes, HP, ITGB2, and CD14, associated to APT_B progression in patients with DM₂ from whole peripheral blood. These genes are able to discriminate patients with DM₂ in either active or latent tuberculosis infection. In addition, due to their high degree of sensitivity and specificity, these biomarkers could be used to evaluate the effectiveness of TB-drug treatment in patients with DM₂. The study identified two phases of progression from LTT_B to APT_B in the group of individuals with DM₂. Finally, the results provide the basis for developing a simple diagnostic test that allows detection of patients with DM₂ in the process of reactivating the LTT_B.

I. ANTECEDENTES

I.1. Asociación de la diabetes mellitus y la tuberculosis. Después del SIDA, la tuberculosis es la infección que más produce muertes en adultos en el mundo (1) generando 8 millones de casos nuevos y 2 millones de muertes al año (2,3). Los esfuerzos para erradicar la enfermedad se ven limitados por deficiencias en el diagnóstico y fallas del tratamiento, lo que favorece la selección de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacoresistentes (MTB-MDR). La epidemia global de esta enfermedad está creciendo y cada vez es más peligrosa, principalmente por los brotes epidémicos producidos por cepas de MTB-MDR, para los cuales el tratamiento es más complicado y costoso. Además, las fallas en los sistemas de salud para el control de pandemias como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas asociadas a la vejez y a los malos hábitos alimenticios de la población humana, son factores de riesgo para el desarrollo de la tuberculosis pulmonar (TBPA) (4).

En particular, estudios realizados en países desarrollados a mitad del siglo pasado, muestran una alta frecuencia de TB entre personas con diabetes (5,6,7). Actualmente, a nivel mundial la proporción de casos de TB con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) varía de 1 a 9.3% (8,9). Recientemente, “The National Health and Nutrition Examination Surveys” (NHANES) reportó tasas elevadas de TB entre individuos con diabetes (10). La mayoría de estos estudios se han hecho en población blanca anglosajona y europea, aunque existen algunos trabajos hechos dentro de la población nativa americana. Un ejemplo de ellos, es un estudio de casos y controles que examinó a la DM2 como un factor de riesgo para la reactivación de TB en indios americanos con prueba de tuberculina positiva (PPD+) (11). En este trabajo se encontró que la TB fue 5 veces más frecuente entre pacientes con DM2 con prueba de PPD+, que en pacientes sin DM2 con PPD+. Aunque este estudio sugirió que la DM2 está fuertemente asociada con un valor de riesgo mucho más alto de reactivación en indios americanos, no determinó si la incidencia primaria de TB está alterada por la presencia de DM2. Así, mientras la mayoría de los estudios en el pasado muestran una asociación entre la DM2 y la TB, la naturaleza y magnitud de esta asociación no ha sido claramente determinada.

En México existe un reporte muy interesante sobre la asociación de DM2 y TBPA, que muestra que la incidencia de TB fue significativamente mayor entre individuos con DM2 que entre población sin DM2 (209.5 vs 30.7/100,000 personas por año respectivamente, $p < 0.001$) (12). En este estudio, los datos indican que el riesgo de desarrollar la TB debido a la presencia de la DM2 fue del 25%. Basados en este valor, se estimó que el 25% de todos los casos de TB pudieron ser evitados si la TB entre pacientes con DM2 hubiese sido

prevenida al tratar a los pacientes con la infección latente (TBLT), o reduciendo los contactos en este grupo de alto riesgo. En este reporte se concluye que la co-morbilidad con DM2 puede incrementar las tasas de TB tanto como la co-infección con VIH, un hallazgo con importantes implicaciones para el establecimiento de políticas encaminadas al otorgamiento de recursos para programas de salud relacionados con estos padecimientos.

Aún sin el posible impacto de una prevalencia creciente de DM2, la TB se mantiene entre una de las enfermedades transmisibles más importantes y como la segunda causa de muerte por infección de un solo microorganismo en el mundo. La mayoría de los casos ocurre en países menos desarrollados (13). En México la TB continúa como un problema de Salud Pública de grandes proporciones con una tasa estimada de 50/100,000 habitantes (14). Aunado a esto, las poblaciones latinoamericanas podrían estar en mayor riesgo de contraer DM2 y en consecuencia TB, debido a la endemidad de esta última dentro de Latinoamérica. Como mencionamos, se ha postulado que personas con ascendencia precolombina mesoamericana pueden estar genéticamente predisuestas a desarrollar DM2. Esta idea es apoyada por observaciones que muestran que las personas de origen hispano, presentan un mayor grado de resistencia a la insulina que una población asociada en términos clínicos y sociodemográficos, con ancestros europeos. Además, mientras más grande sea la ascendencia hispana, mayor es la probabilidad de presentar resistencia a la insulina (15).

En una era marcada por una mayor esperanza de vida en la población, el incremento de la obesidad debida a la disminución de actividad física, parece condicionar la emergencia de una epidemia metabólica. Así, la convergencia de dos epidemias, una metabólica y otra infecciosa, ilustra la forma en la que los padecimientos crónicos se adicionan a los problemas de Salud Pública, debido a enfermedades infecciosas durante el proceso de desarrollo económico de un país (16).

I.2. Estudios epidemiológicos de la DM2 en México y en la población hispana de los Estados Unidos de Norte América. El incremento de la prevalencia de la DM2 en países desarrollados y el posible aumento de riesgo para adquirir la TB se han convertido en un reto para su control. Este reto se observa en las estimaciones de la OMS que indican que el número de personas con DM2 será más del doble para el año 2030, esto último en parte como una consecuencia del envejecimiento poblacional y de la urbanización (17). Se ha determinado que los mayores incrementos ocurrirán en países en desarrollo y en inmigrantes que viven en países desarrollados. Esta tendencia es evidente en los Estados Unidos de Norte América en donde la prevalencia de DM2 se incrementó de 5.8 millones en 1989 a 13.3 millones en 2002; siendo los individuos con origen hispano los más afectados (18). En México, el incremento en la DM2 de 1993 al año

2000 fue de 6.7% a 8.18% respectivamente (19,20). Sin embargo, las estadísticas no reflejan completamente la realidad existente debido a problemas de subregistro en las bases de datos actuales.

De los dos tipos principales de diabetes conocidas: la tipo 1 (DM1, enfermedad autoinmune, anteriormente conocida como diabetes dependiente de la insulina) y la tipo 2 (DM2, anteriormente conocida como diabetes no dependiente de la insulina), la segunda tiene mayor relevancia porque ocurre en aproximadamente el 90% de las personas, caracterizándose principalmente por una resistencia a la insulina. De ahí que la mayor parte de la investigación en diabetes se enfoque principalmente al estudio de la resistencia a la insulina, anormalidad fisiológica seminal en la patogénesis de la DM2, la cual se manifiesta como una disminución de la captación de glucosa en todo el organismo; los tejidos que dependen de la insulina para utilizar la glucosa son el músculo esquelético y el tejido adiposo. En individuos aparentemente sanos se presentan diferentes grados de resistencia a la insulina y se ha reportado que un tercio de la población con resistencia a la insulina presenta el riesgo más alto de desarrollar la DM2 (21).

1.3. La patogénesis y la respuesta inmune en la diabetes mellitus tipo 2. Las condiciones de diabetes y obesidad cursan con alteraciones en la síntesis de proteínas de fase aguda tales como la Proteína C Reactiva (PCR) y el Factor Inhibidor-Activador de plasminógeno tipo 1, los cuales están relacionados con el desarrollo de la resistencia a la insulina y la alteración endotelial (22,23).

Los individuos resistentes a la insulina pueden permanecer tolerantes a altos niveles de glucosa si el páncreas compensa este defecto mediante la secreción de grandes cantidades de insulina (Hiperinsulinemia), pero cuando ésta no puede ser compensada, las concentraciones de insulina plasmática empiezan a declinar y sobreviene una franca DM2. Así, por principio, la DM2 tiene un origen genético muy importante, relacionado con individuos que presentan congénitamente una alta susceptibilidad al desarrollo de resistencia a la insulina. Sin embargo, los principales factores de riesgo que influyen para su desarrollo, incluyen cambios en el estilo de vida de los individuos tales como el sobrepeso, la inactividad física, la hipertensión arterial y la mala alimentación (21).

Se conoce poco de la función inmune en la DM2. Por mucho tiempo se ha considerado que la DM2 está asociada con fallas en la migración de neutrófilos, en la fagocitosis y en la actividad bactericida de ciertas células, lo cual podría explicar la predisposición de los pacientes con DM2 a padecer infecciones intracelulares. Además, los monocitos de pacientes con DM2 mal controlada exhiben actividad bactericida reducida, asociada a una incapacidad para realizar el estallido respiratorio. En contraste, los monocitos de personas con DM2 bien controlada se comportan normalmente, es decir, tal y como sucede en los individuos sin DM2. La mayoría de los estudios también han mostrado que los individuos con DM2 tienen niveles más

bajos de linfocitos circulantes comparados con sujetos sanos, incluyendo una reducción en la subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ (9, 24).

I.4. La respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar. La historia natural de la infección tuberculosa muestra claramente la importancia de la respuesta inmune tanto innata como adquirida para el control de la enfermedad. Entre personas igualmente expuestas a un caso contagioso de TB, el 70 % de estas se mantienen sin infección, mostrando la importancia de la respuesta inmune innata para el control de la TB. El restante 30 % de las personas expuestas al bacilo, pueden quedar infectadas, estimándose que el 90 % de estos individuos infectados por primera vez, presentarán TBLT durante toda su vida, sin mostrar síntomas clínicos, pero presentando bacilos vivos en lesiones granulomatosas del pulmón, nódulos linfáticos, y otros órganos. Si consideramos que un tercio de la población mundial tiene TBLT, la reactivación de ésta por la aparición o la inducción de inmunosupresión, como ocurre con el tratamiento anti-TNF en pacientes con artritis reumatoide, puede incrementar aún más los casos de TB, ya que mediante este tratamiento se alteran los mecanismos esenciales de respuesta protectora mediados por TNF en contra de la infección por *M. tuberculosis*. En el caso de los pacientes con DM2 y con TBLT, esta última se puede reactivar de igual forma, debido al estado de inmunosupresión en la que se encuentra este grupo de pacientes, según los mecanismos ya señalados.

Actualmente se sabe poco sobre la naturaleza de la respuesta inmune innata en la TB, pero es probable que esté determinada por las propiedades bactericidas dependientes del óxido nítrico de los macrófagos alveolares y por la activación celular a través de receptores tipo Toll (25). Se ha demostrado, que en ciertas células alveolares, principalmente en macrófagos provenientes de individuos sanos, la infección por *M. tuberculosis* induce la expresión y producción de la catelicidina hCAP-18/LL37, un péptido antimicrobiano, que induce la destrucción y eliminación de este patógeno (24). También, se ha reportado que la expresión disminuida de ciertos genes en el humano, relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos está relacionada con fallas en la respuesta inmune innata ante la infección por microorganismos oportunistas en individuos con DM1 (26). En contraste, es claro que la respuesta inmune adquirida contra TB reside principalmente en el sistema inmune celular, y que ésta es dependiente de la estructura y composición celular del granuloma, en el cual el TNF- α es una molécula muy importante para la quimiotaxis de las células T, CD4+ y CD8+ y los macrófagos. En este sentido, la activación del macrófago es esencial para este proceso (27).

Algunos estudios en modelos experimentales de TBPA y en humanos, muestran que dentro del granuloma, *M. tuberculosis* reside en el compartimento fagolisosomal del macrófago. La IL-12, producida

por macrófagos infectados con *M. tuberculosis* es indispensable para la producción de IFN- γ y TNF- α . En este contexto, una respuesta Th1 es crítica para brindar respuesta inmune protectora en contra de MTB (28, 29). Así, para que ocurra una respuesta Th1 es primordial la activación de los macrófagos en la producción de IFN- γ por las células T CD4⁺ y CD8⁺. En este sentido, el TNF- α no solo aparece como colaborador de IFN- γ para maximizar la actividad del macrófago, sino que es importante, al menos en el ratón, para el desarrollo y mantenimiento del granuloma (30). En conjunto, estos estudios sugieren que la inmunidad protectora en el humano hacia la TBPA es conferida por una respuesta Th1, en la cual la participación del macrófago, los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y la producción balanceada de IFN- γ , TNF- α e IL-12, es fundamental.

Desde el punto de vista inmunológico, las fallas en la respuesta de células Th1 guían hacia la progresión de la infección latente a la enfermedad activa, ocurriendo al mismo tiempo un proceso inmunopatológico destructivo caracterizado por inflamación, fibrosis, y formación de cavernas (31). En este contexto, el cambio profundo en la estabilidad del granuloma que contiene bacilos viables sin replicación, conduce a la reactivación del bacilo por un proceso de daño tisular progresivo con bacilos en alta actividad replicativa. Esto coincide con un cambio de la respuesta Th1 protectora a una respuesta Th2, caracterizada por la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-6 e IL-10, y de manera paradójica, con una producción incrementada de TNF- α , que desencadena los efectos citotóxicos nocivos en el área infectada. Así, parece que los bajos niveles de TNF- α limitan la respuesta inmune del huésped, mientras que los excesivos niveles de esta molécula pueden causar daño tisular. De lo anterior, se puede concluir que la respuesta inmune hacia *M. tuberculosis* involucra cambios en la respuesta inflamatoria que son esenciales para el control de la replicación del bacilo. Cuando ocurre una alteración en el balance de esta respuesta, se da una reacción granulomatosa intensa en los pulmones de los individuos infectados que produce daño tisular y fallas en la función pulmonar.

En nuestro conocimiento, existen pocos estudios acerca de la función inmune en pacientes con DM2 y TB (32,33). Por ejemplo, en algunos de estos estudios se midió la producción *ex-vivo* de citocinas por células T, CD4⁺ co-cultivadas con monocitos autólogos estimulados con *Mycobacterium bovis* BCG. Dichos estudios mostraron que cuando la DM2 es mal controlada, se reduce la producción de citocinas Th1, las cuales sustentan la respuesta protectora en el caso de la infección tuberculosa. Particularmente, la producción de IFN- γ fue significativamente más baja en pacientes con DM2 y con TB comparado con pacientes sin DM2 y con TB, o con individuos sanos. La producción de IFN- γ se encontró inversamente relacionada con los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c), y la síntesis de TNF- α e IL-1 se redujo en

pacientes con TB y con la DM2 mal controlada comparada con pacientes con buen control de la DM2, o que sólo tenían TB. Estos datos están relacionados con los obtenidos por nuestro grupo, en donde se ha observado que los individuos con mal control en su DM2 son más susceptibles a la infección con MTB.

Se ha sugerido que *M. tuberculosis* altera cascadas de moléculas inflamatorias importantes para el control de la infección tuberculosa y que conllevan a eventos inmunopatológicos. Desafortunadamente, no se conocen las rutas de regulación que modulan el balance entre moléculas pro-inflamatorias o inhibitoras de la respuesta inmune. Mucho menos se conocen los mecanismos que se asocian con el proceso patológico durante la co-morbilidad con DM2. Sin embargo, resulta lógico pensar que la conjunción de ambas enfermedades incrementa el desbalance de la respuesta inmune y que esto altera la capacidad del individuo para desarrollar una respuesta inmune protectora en contra de *M. tuberculosis*, lo que pudiera repercutir directamente en el desarrollo de la enfermedad progresiva grave.

I.5. El diagnóstico de la tuberculosis latente. En la actualidad es difícil predecir con exactitud quién y cuándo, entre los pacientes con infección latente por *M. tuberculosis*, desarrollará TBPA. Por lo tanto, se hace necesario desarrollar pruebas más sensibles y específicas que permitan realizar un diagnóstico más preciso, con el propósito de tratar en forma oportuna a aquellos pacientes con TBLT antes de que desarrollen la enfermedad activa y de esta forma, evitar su propagación. De igual manera, es fundamental desarrollar un método más sensible y específico para evaluar la eficacia de tratamiento con nuevos antifímicos o para la evaluación de nuevas vacunas.

La prueba intradérmica de la tuberculina (TST) también conocida como PPD se ha usado por décadas para diagnosticar la TBLT. Esta prueba mide la inmunidad mediada por células en la forma de una respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío hacia un Derivado Proteico Purificado (PPD) de *M. tuberculosis*. Desafortunadamente, su especificidad es baja en poblaciones con alta cobertura en vacunación con BCG o expuestas a micobacterias ambientales. Su sensibilidad puede ser baja en individuos inmunocomprometidos, como en pacientes con SIDA o en pacientes con otras condiciones de inmunosupresión, tal como pacientes con DM2 o con desnutrición severa o en casos de TB avanzada (34).

Recientemente, en algunos países han salido al mercado alternativas al PPD: la prueba de Quantiferon-TB[®] (QFT) (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria Australia), y la prueba de T SPOT-TB[®] (Oxford Immunotec, Oxford, UK). Ambas pruebas miden la inmunidad mediada por células mediante la cuantificación de IFN- γ secretado por las células T en respuesta a antígenos específicos de *M. tuberculosis* por medio de ELISA y ELISPOT, respectivamente. La segunda generación de QFT, la prueba de QuantiFERON-TB Gold[®]

(QFT-Gold), es una prueba en sangre total que mide la producción de IFN- γ en respuesta a los antígenos ESAT-6 y CFP-10 por medio de ELISA (34,35).

Las proteínas ESAT-6 y CFP-10, codificadas por los genes Rv3874 y Rv 3875 localizados dentro de la región de diferenciación 1 (RD1) del genoma de MTB, son significativamente más específicas que las proteínas de PPD y ambas juegan un papel esencial en la patogénesis de la TB (36); éstas son producidas por *M. tuberculosis* y están ausentes en todas las preparaciones de vacunas BCG y en micobacterias ambientales, con la excepción de *M. kansasii*, *M. marinum*, y *M. szugai*. Por lo tanto, la prueba no se ve afectada por completo por la vacunación con BCG, ni por la sensibilización producida en el humano por la mayoría de las micobacterias ambientales, lo que asegura una confiable predicción de la infección tuberculosa. La prueba detecta tanto infección activa como infección latente; sin embargo, los pacientes con resultados positivos requieren de estudios adicionales (37).

En los contactos de pacientes con TBPA que no han sido vacunados con la BCG, la prueba de QFT-Gold discrimina entre grupos de alto y bajo riesgo. Entre los contactos vacunados con la BCG, la prueba de QFT-Gold muestra una alta correlación con la exposición a *M. tuberculosis*, con una especificidad del 99% y con una sensibilidad del 90%, mientras que la prueba del PPD tiene una sensibilidad del 89% (38). La sensibilidad del QFT junto con la prueba de PPD tiene una sensibilidad de hasta un 96% (39). A pesar de lo señalado previamente, todavía faltan estudios que den evidencias concretas sobre la valoración de estas pruebas para el manejo de individuos inmunocomprometidos, o para el diagnóstico en pacientes con DM2, quienes son más propensos a presentar falsos negativos en la prueba del PPD, y los cuales una vez infectados, están en alto riesgo de progresar hacia la TBPA (34).

Por lo tanto, se hace necesaria una prueba de diagnóstico eficaz que permita identificar pacientes con DM2 con infección activa, ya que, si consideramos que un tercio de la población mundial tiene TBLT, la reactivación de ésta a enfermedad activa debida al estado de inmunosupresión en la que se encuentra este grupo de pacientes, puede incrementar aún más los casos de TB en forma considerable. De esta manera, la identificación de un grupo de marcadores moleculares que sirva como huella transcripcional asociada a enfermedad tuberculosa en humanos, permitiría establecer las bases para el desarrollo de una prueba diagnóstica para la TBPA en este grupo importante de pacientes inmunocomprometidos.

1.6. El uso de microarreglos de DNA para el estudio de la relación huésped-patógeno. Recientemente se han documentado los cambios en la expresión genética que ocurren durante la infección con diferentes especies de microorganismos en diferentes tipos celulares (40,41). Los datos obtenidos muestran que las células del huésped experimentan una marcada reprogramación de su transcriptoma durante la infección.

Tanto las células dendríticas, como los macrófagos, los neutrófilos y los monocitos de sangre periférica responden a un grupo amplio de estímulos bacterianos con programas específicos de activación transcripcional, preferencialmente de sobrerregulación, acorde al tipo celular del huésped y al tipo de patógeno involucrado. Cuando se analiza a través del tiempo, se observa que estos cambios de la expresión genética reflejan la naturaleza temporal de la respuesta inmune y que las células inmunes, regulan la expresión genética de una manera patógeno-específica. Así, algunas bacterias estimulan menos cambios de expresión genética que otras. Por ejemplo, los macrófagos infectados con micobacterias vivas muestran una disminución en la expresión de aproximadamente 35% de los genes que son expresados cuando los macrófagos son expuestos a células muertas de *M. tuberculosis*. Esto parece tener explicación en el hecho de que cuando *M. tuberculosis* está viable, tiene la capacidad de inhibir la expresión de algunos genes, incluyendo TNF y IL-12B. De igual forma, se ha encontrado que los macrófagos que fueron expuestos a micobacterias tuberculosas viables produjeron niveles más bajos de IL-12 e IL-15, con respecto a macrófagos expuestos a otro tipo de micobacterias no patógenas al hombre. Como es bien conocido, la IL-12 juega un papel fundamental en la inducción de la respuesta inmune Th1 y es crucial para la resistencia del huésped a la infección tuberculosa.

En particular, el análisis de microarreglos aplicado al estudio de la relación huésped-patógeno, nos puede permitir conocer el perfil de expresión genética del huésped a un proceso infeccioso. En este trabajo de tesis en particular, dicho perfil nos puede ayudar a identificar a un grupo de genes asociados específicamente al desarrollo de TBPA. De esta forma, el perfil de expresión puede ser usado como una “huella digital” que distinga a una enfermedad en particular y señalar en forma cualitativa y cuantitativa, los genes del huésped que cambian en expresión durante la progresión de tuberculosis latente a enfermedad tuberculosa activa.

1.7. El perfil de expresión genética y su uso como “huella digital transcripcional” en diversas patologías. La hipótesis fundamental en los estudios de expresión genética es que la abundancia relativa de ciertos transcritos o mRNAs, representa la respuesta celular a un estado fisiológico particular. Para detectar y cuantificar estos cambios en la expresión de genes se han descrito algunos métodos como son la RT-PCR en tiempo real, el uso de sondas marcadas, los genes reporteros y recientemente, la hibridación a microarreglos de DNA. En particular, un microarreglo de DNA es una impresión ordenada de sondas de secuencia conocida sobre un soporte sólido, fabricados a muy pequeña escala, el cual es usado para interrogar en un solo experimento, la composición de mezclas abundantes de DNA, o la expresión diferencial de cientos o miles de RNA mensajeros entre grupos experimentales y controles. En este último

caso, el análisis define patrones de expresión que pueden ser considerados como la “Huella digital transcripcional” de una célula o de un tejido en respuesta a un estímulo específico. Esta huella digital puede utilizarse como marcador molecular para el diagnóstico de ciertas enfermedades, o bien, para pronosticar la evolución de pacientes con determinadas patologías (42).

Los microarreglos pueden ser usados para caracterizar la función de nuevos genes, identificar genes en una ruta biológica, analizar la variación genética y para identificar blancos de drogas terapéuticas. Los perfiles de expresión genética determinados mediante el análisis de microarreglos de DNA, han sido usados para estudiar los genes involucrados en estados de enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide, (43-46), en la tumorigénesis, en el cáncer colorectal, así como en la identificación de marcadores potenciales de desarrollo y progresión neoplásico (47,48); en cáncer pancreático (49), en la clasificación de leucemia mieloide aguda (50), en la clasificación de subgrupos de pacientes con síndrome ovárico poliquístico (51) y en la detección temprana de cáncer de seno (52), así como en el diagnóstico de cáncer cutáneo (53). De igual forma, se han usado en la identificación de nuevos genes en la esclerosis múltiple, en la enfermedad de Alzheimer, en padecimientos cardiopulmonares, y en la hepatitis viral (42), así como en la identificación de agentes virales que atacan el Sistema Nervioso Central (54). También, mediante el análisis de microarreglos de expresión, se han desarrollado biomarcadores potenciales que permiten establecer las causas de leucemia en poblaciones de trabajadores expuestos al benceno (55).

Además, la tecnología de microarreglos de DNA para estudiar perfiles de expresión genética es muy útil para discernir las bases moleculares de padecimientos de naturaleza compleja como en la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) (56,57) y en la DM2 (58), así como en la TB (59). En pacientes con DM2 estos perfiles de expresión genética se han usado como marcadores moleculares de alteraciones en la actividad cardiopulmonar y arresto cardioplégico, ya que éstos son cualitativa y cuantitativamente diferentes en relación a pacientes sin DM2 (60). Mistry y colaboradores en el 2007 identificaron en los monocitos de sangre periférica de humano, un perfil de expresión característico de la TBPA, el cual que podría ser usado para predecir la progresión de la TBLT hacia la infección activa en individuos sin ninguna sintomatología clínica; estos autores sugieren que el tratamiento quimioproláctico se justificaría en aquellos individuos sanos con la prueba de la tuberculina positiva y con un perfil de expresión característico de la TBPA (61).

1.8. Identificación de marcadores moleculares de desarrollo a tuberculosis pulmonar activa en un modelo de ratón. Para identificar la expresión diferencial de mRNA's involucrados en la respuesta del huésped durante el desarrollo de la TBPA, nuestro grupo de investigación previamente usó un modelo *in vivo* de tuberculosis experimental para aislar RNA total de pulmones de ratones y realizar ensayos de

hibridación a microarreglos de alta densidad conteniendo secuencias correspondientes a más de 12,500 genes de función conocida (MG-U74Av2 Genechip Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). El agrupamiento jerárquico de los datos de hibridación a los microarreglos y el análisis de similitud de los patrones de expresión, permitieron identificar un transcriptoma característico, correspondiente a la huella transcripcional de la respuesta *in vivo* de ratones infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Para aumentar la especificidad de esta respuesta y considerando que el extensivo uso de la vacuna de BCG pudiera dar una respuesta de fondo, se substrajeron los valores de expresión de todos los genes similarmente inducidos en ratones infectados con la cepa vacunal de BCG usada en México y todos los genes constitutivamente expresados en pulmones de ratones no infectados. Así, se identificaron 362 marcadores moleculares de la respuesta del huésped asociados a la TBPA. Dicha expresión se confirmó con un grupo de 50 genes seleccionados arbitrariamente, mediante PCR cuantitativa. Aunque muchos de los genes inducidos por H37Rv estaban implicados en la respuesta inmune, incluyendo IFN- γ , TNF- α , quimiocinas y otras moléculas proinflamatorias, varios de los genes identificados no han sido previamente relacionados con la patogénesis de la TB, por lo que se sugirió que representan genes reguladores de nuevas cascadas de activación en respuesta a la infección tuberculosa, o marcadores de progresión de la enfermedad. Debido a lo anterior, se utilizó el programa "Ingenuity Pathways" (Affymetrix, Santa Clara) y se logró identificar redes de regulación de respuesta del huésped asociadas con daño tisular distintivo de TBPA (Enciso Moreno, J. A., comunicación personal). Dado que los 362 genes identificados en el ratón pueden tener un gene correspondiente en función y estructura en humanos, este patrón de expresión particular de respuesta asociado a la infección tuberculosa activa, podría ser usado para la identificación de marcadores moleculares en humanos que estén en riesgo de desarrollar TBPA antes de presentar síntomas clínicos. Aplicado a individuos con TBLT, con y sin DM2, dicho patrón permitiría identificar a los pacientes que estuviesen en riesgo de desarrollar la TBPA con el fin de suministrarles tratamiento profiláctico, antes de que presenten la enfermedad activa, y de esta forma disminuir la transmisión de la TB.

II. JUSTIFICACIÓN

No se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que se alteran cuando individuos con tuberculosis latente desarrollan tuberculosis pulmonar, ni los mecanismos de desbalance metabólico asociados a la diabetes mellitus tipo 2 que puedan intervenir en la susceptibilidad de estos pacientes al desarrollo de tuberculosis activa; tampoco se sabe cómo estos mecanismos operan cuando ambos padecimientos ocurren simultáneamente. En este sentido, el análisis global de los cambios transcripcionales usando la metodología de microarreglos de expresión en pacientes que sufren estas condiciones, es una de las mejores estrategias disponibles para identificar de manera simultánea, rápida y certera, los genes de respuesta del huésped relacionados con la progresión a la enfermedad activa a partir de la infección tuberculosa, estando presente o no la diabetes mellitus tipo 2.

Los resultados de este estudio permitirán identificar los mecanismos de respuesta del huésped hacia estas dos enfermedades, permitiendo sugerir alternativas para el diagnóstico y control de los pacientes con diabetes tipo 2 infectados con *Mycobacterium tuberculosis* que estén en riesgo de desarrollar tuberculosis pulmonar, con el objeto de que dichos pacientes reciban tratamiento profiláctico en forma adecuada y oportuna.

III. HIPÓTESIS

Los marcadores moleculares de respuesta del huésped asociados con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo experimental de ratón, corresponden a la huella transcripcional presente en sangre periférica completa de humanos infectados en forma latente con *M. tuberculosis* con y sin diabetes mellitus tipo 2 en progresión a tuberculosis pulmonar activa.

IV. OBJETIVOS

IV.1. GENERAL

Identificar marcadores moleculares asociados con la tuberculosis pulmonar activa en pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2 presentes en sangre periférica, que sirvan como marcadores de progresión de tuberculosis latente a tuberculosis pulmonar activa.

IV.2. ESPECÍFICOS

1. Obtener 60 muestras de sangre periférica de individuos con y sin diabetes mellitus tipo 2 de los subgrupos clínicos: 1) No infectados con *M. tuberculosis* (controles), 2) Infectados con *M. tuberculosis* en forma latente (TBLT) y 3) Infectados con *M. tuberculosis* en forma activa (TBPA), que reúnan los criterios de selección preestablecidos en este estudio.
2. Identificar los genes de humano que presentan homología con los genes asociados con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo experimental de ratón.
3. Diseñar un microarreglo de expresión prototipo que contenga: a) los genes de humano que presentan homología con los genes asociados con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo experimental de ratón; b) genes asociados con la respuesta inflamatoria en el humano; c) genes de humano que codifican para la producción de péptidos antimicrobianos y d) genes candidato en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2 en el humano.
4. Identificar, mediante los ensayos de microarreglos de expresión, los genes asociados con la progresión a tuberculosis pulmonar activa en individuos con o sin diabetes mellitus tipo 2.
5. Comprobar y cuantificar, mediante RT-PCR en tiempo real, los niveles de expresión del grupo de genes identificados previamente por microarreglos.
6. Identificar *in silico* la función biológica de los genes identificados asociados con la progresión a tuberculosis pulmonar activa.
7. Establecer las bases para la generación de una prueba diagnóstica que permita identificar a los individuos con tuberculosis latente, con o sin diabetes mellitus tipo 2, que estén en riesgo de desarrollar tuberculosis pulmonar activa.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar los estudios de expresión genética, en el presente trabajo se consideró la utilización de nuevas y mejores tecnologías para la construcción de los microarreglos. Asimismo, se planteó usar procedimientos optimizados para la preparación de las muestras de RNA, con el propósito de tener resultados más robustos, que nos permitan identificar las diferencias a nivel transcripcional de los diferentes grupos de individuos que conforman el presente trabajo, tal y como se describe a continuación (figura 1):

1. Para la construcción del microarreglo se escogió la plataforma CustomArray 4X2K de CombiMatrix (62). Esta plataforma se ajustó a nuestras necesidades, ya que la tecnología que emplea para la síntesis de los oligonucleótidos está basada en la síntesis electroquímica *in situ*, lo cual nos permitió hacer el diseño específico del microarreglo considerando sólo los genes de nuestro interés; esto permite que los costos de producción se disminuyan en forma considerable (hasta en una tercera parte en relación a los microarreglos con oligonucleótidos presintetizados e impresos en laminilla). Además, los oligonucleótidos sintetizados mediante dicha tecnología tienen una especificidad a sus respectivos blancos del 100%, lográndose con ello, un alto grado de detección de señales y una alta sensibilidad. Un aspecto importante adicional es que estos arreglos pueden ser usados hasta 4 veces mediante el uso de un sistema especial de lavado.

2. Ya que el presente trabajo involucra un estudio multicéntrico a diferentes tiempos y en diferentes lugares, se consideró conveniente la utilización del sistema PAXgene™ (PreAnalytiX, GmbH, Switzerland). Este sistema está conformado, en primer lugar, por los tubos PAXgene™ que son usados para la recolección, transporte y conservación de las muestras sanguíneas y, en segundo lugar, por un sistema de extracción de RNA mediante el uso de columnas. Dicho sistema permite mantener las muestras sanguíneas a temperatura ambiente por varias horas a partir de su obtención, o bien a -80 °C durante varios meses sin que se altere la estabilidad del RNA, y sin producir cambios transcripcionales significativos *ex vivo*, congelando los perfiles de expresión genética global al momento de la toma sanguínea (63).

3. Debido a que el contenido de transcritos de globina en las muestras de RNA total extraídas a partir de sangre completa (70%), reduce la sensibilidad en la detección de los genes hasta cerca de un 50%, e incrementa la variabilidad en los perfiles de expresión entre los diferentes ensayos de microarreglos (64), se incluyó en la metodología el procedimiento "GlobinClear-human" (AMBION, Inc. USA), con el propósito de

eliminar dichos transcritos de globina, e incrementar la sensibilidad de detección en los ensayos de hibridación a los arreglos, así como para reducir la variabilidad entre los ensayos.

4. Ya que el Método Van Gelder-Eberwine es considerado el estándar de oro para la amplificación lineal de las secuencias blanco usado en estudios de microarreglos de expresión, se seleccionó el sistema "MessageAmp II-Biotin *Enhanced* single round aRNA amplification kit" (AMBION. Inc. USA.), el cual emplea este método de amplificación. Con este sistema se puede realizar tanto la amplificación y marcaje con biotina de las muestras de RNA, así como su fragmentación para su posterior hibridación a la plataforma del microarreglo CustomArray 4X2K de CombiMatrix (65).

5. Para aumentar la confiabilidad de los ensayos de hibridación de las muestras experimentales de cRNA-biotina, en el diseño del microarreglo se incluyeron genes homólogos y heterólogos como controles positivos y para normalizar los valores de hibridación al microarreglo. Como genes heterólogos se usaron transcritos de *A. thaliana* (SpotReport *A. thaliana* mRNA Spikes) (Stratagene, Inc, USA) con el objeto de verificar la efectividad de los procesos de amplificación y marcaje, así como para determinar la sensibilidad y la funcionalidad del microarreglo.

Dado que el trabajo involucra una plataforma clínico-epidemiológica multicéntrica, nuestra estrategia general consideró algunos de los puntos descritos por Debey y colaboradores (66).

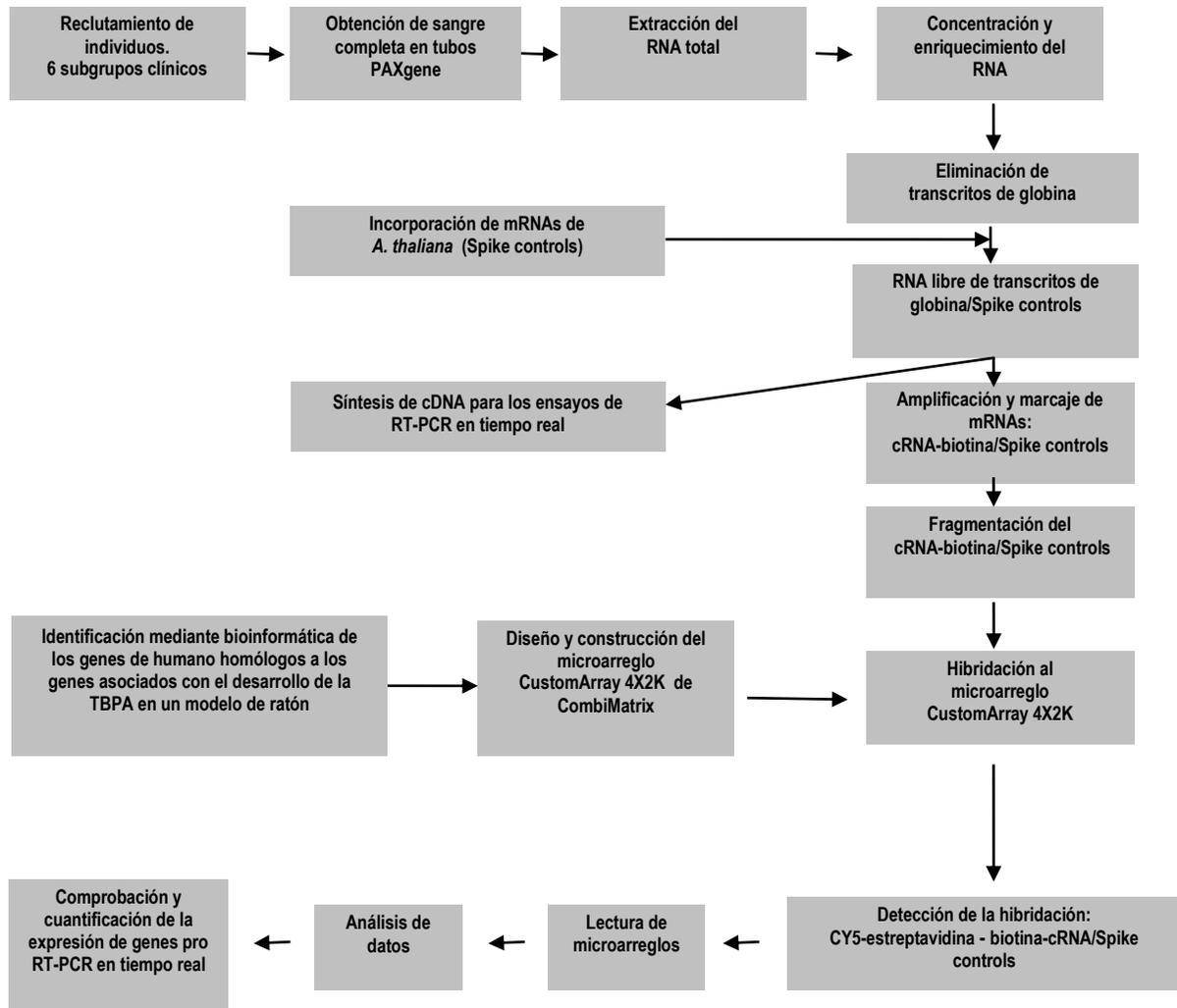


Figura 1. Estrategia general de trabajo.

V.1. Identificación, mediante bioinformática, de los genes de humano que presentan homología con los genes asociados con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo experimental de ratón. Dentro de los diferentes grupos de genes que debería contener el microarreglo de expresión a utilizar en el presente trabajo, se consideró a un grupo de genes homólogos de humano involucrados en la progresión a TBPA identificados previamente por nuestro equipo en un modelo de ratón. Para ello se realizó la búsqueda de los correspondientes genes homólogos en el humano, mediante las herramientas de la bioinformática.

Se contó con una lista de 362 secuencias de genes involucrados en la infección pulmonar activa por *M. tuberculosis* a partir del análisis de expresión por microarreglos en un modelo experimental de ratón, utilizando microarreglos de expresión de alta densidad, conteniendo secuencias correspondientes a más de 12,500 genes de función conocida (Affymetrix Murine Genechip U74Av2, Santa Clara, CA, USA) (Enciso Moreno, JA. Comunicación personal).

Para identificar las secuencias homólogas de humano, se partió de la clave de la clona (secuencia), o en alguno de los casos del nombre del gene. A partir de la lista original de datos de las secuencias de oligonucleótidos con señales de hibridación al 100%, se realizó la búsqueda de los genes homólogos correspondientes, en las siguientes bases de datos en la Internet: a) SOURCE Stanford, b) Entrez Nucleotide, y c) PubMed (Apéndice 1).

V.2. Diseño y construcción del microarreglo de expresión CustomArray 4X2K de CombiMatrix. A pesar de que originalmente se realizó el diseño de oligonucleótidos para su síntesis e impresión en laminillas de vidrio de las secuencias que conformaría el microarreglo, en la literatura existen otras plataformas que presentaban muchas más ventajas y menor costo, en relación a la impresión de los oligonucleótidos presintetizados.

Así, se identificó que la compañía CombiMatrix (Mukilteo, Wa., USA) ha desarrollado una plataforma de microarreglo sectorizado 4X2K, que consiste de un semiconductor de silicio que contiene 2,240 microelectrodos de platino por cada uno de los cuatro sectores del microarreglo, el cual es montado sobre una laminilla de cerámica de 7.5 cm x 2.5 cm. La ventaja es que en cada electrodo de platino es posible realizar la síntesis de un oligonucleótido distinto. La síntesis *in situ* de las secuencias de interés se realiza sobre los microelectrodos embebidos en un circuito eléctrico dentro del silicio y se controla por un programa de computadora. La síntesis se basa en la química de la fosforoamidita y ocurre en miles de sitios simultáneamente de acuerdo a un algoritmo de computadora, que activa o dirige dicha síntesis sólo en aquellos electrodos especificados. En el proceso de síntesis se genera ácido en forma selectiva mediante una reacción electroquímica, la cual, a su vez, controla la reacción de destitilación durante la síntesis de los oligonucleótidos, dirigiendo el patrón de dicha reacción mediante un programa de computadora (62).

La superficie del microarreglo semiconductor está recubierta con una "Película de reacción porosa orgánica". Esta película soporta el anclaje de las moléculas sintetizadas y sirve para controlar la densidad de las moléculas de DNA sintetizadas sobre el chip, facilitando el confinamiento de los reactivos químicos sobre cada microelectrodo. Así, esta película forma un medio acuoso en tercera dimensión que favorece la

hibridación, permitiendo una máxima interacción entre las sondas y los blancos. Este ambiente mejorado de hibridación resulta en una alta especificidad de la sonda, un alto grado de detección de señales, y una sensibilidad incrementada. Una ventaja adicional importante es que los microarreglos de expresión de CombiMatrix pueden ser usados hasta 4 veces utilizando un sistema especial de lavado.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando el programa “CombiMatrix Probe Design Software System™”, y fue realizado con apoyo de asesores científicos de CombiMatrix (Mukilteo, Washington, USA). La fabricación de los microarreglos de expresión CustomArray 4X2K fue hecha por la compañía CombiMatrix, utilizando el sintetizador “CustomArray™ Synthesizer”.

V.3. Reclutamiento de los individuos y obtención del material biológico.

V.3.1. Reclutamiento de individuos. Los individuos que se integraron al estudio se reclutaron a partir de la población abierta en los estados de Zacatecas y Durango, y de los siguientes proyectos de investigación: a) “Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Estado de Zacatecas (Proyecto FOMIX 14834), b) “Caracterización epidemiológica de la tuberculosis latente y marcadores moleculares de progresión a tuberculosis pulmonar en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de las ciudades de Durango y Zacatecas”, proyecto del cual forma parte el presente trabajo de tesis y el cual fue aprobado por el comité de ética del Hospital General de Zona No.1 del IMSS de Zacatecas bajo el registro: F-2005-3-101-23.

V.3.2. Estratificación de los individuos: Los individuos reclutados se estratificaron en dos grupos principales: uno de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y otro de individuos sin diabetes (NO DM2). Cada grupo se subdividió en tres subgrupos clínicos de 10 individuos cada uno: 1) No infectados con *M. tuberculosis* (controles), 2) Infectados en forma latente con *M. tuberculosis* (TBLT) y 3) Infectados en forma activa con *M. tuberculosis* (TBPA) (tabla 1).

Tabla 1. Estratificación de individuos (n = 60; 10 por cada subgrupo clínico).

Subgrupo Clínico	Grupo de Individuos DM2	Grupo de Individuos NO DM2
1) No infectados con <i>M. tuberculosis</i> (controles)	10	10
2) TBLT (asintomáticos)	10	10
3) TBPA (enfermos)	10	10

TBLT: tuberculosis latente; TBPA: tuberculosis pulmonar activa; DM2: con diabetes mellitus tipo 2; NO DM2: sin diabetes mellitus tipo 2.

V.3.3. Criterios de selección de los individuos.

- 1) *Criterios de inclusión para los grupos de individuos con y sin DM2:* Individuos que hayan firmado la carta de consentimiento informado, mayores de 18 años, menores de 65 años, hombres o mujeres, derechohabientes o no del IMSS.
- 2) *Criterios de exclusión para los grupos de individuos con y sin DM2:* Individuos con diabetes insulino-dependiente (DM1), individuos bajo tratamiento con rifampicina o antifímicos por más de 2 semanas, individuos adictos a drogas, pacientes psiquiátricos, con enfermedad inmunosupresora (a excepción de la diabetes mellitus tipo 2); individuos que estén bajo tratamiento con medicamentos inmunosupresores o corticoesteroides, con antecedentes de reacción severa a la prueba de intradermorreacción (PPD), o haberse realizado la prueba de intradermorreacción dentro de ocho semanas previas al estudio.
- 3) *Criterios de inclusión para subgrupos específicos:*
 - 3.1. Subgrupo de pacientes con DM2:
 - a) Pacientes con DM2 no infectados con MTB (controles): Pacientes con DM2 (según los criterios de diagnóstico propuesta por la Asociación Americana de la Diabetes, ADA, en 1997). PPD: negativo, Prueba de anergia: negativa (Candidina: positivo), QuantiFERON-Gold: negativo,

Cuadro clínico negativo para TBPA (no presentar tos de más de dos semanas, no presentar fiebre nocturna, ni pérdida de peso involuntario de más del 10%, COMBE negativo), Radiografía de tórax no sugestiva a TBPA, BAAR: negativo y Cultivo MTB: negativo.

- b) Pacientes con DM2 con infección latente de MTB (TBLT): Pacientes con DM2, PPD: positivo, QuantiFERON-Gold: positivo, Cuadro clínico negativo para TBPA, Radiografía de tórax no sugestiva a TBPA, BAAR: negativo y Cultivo MTB: negativo.
- c) Pacientes con DM2 con infección activa (TBPA): Pacientes con DM2, QuantiFERON-Gold: positivo, Cuadro clínico sugestivo de TBPA y Radiografía de tórax con o sin anomalías sugestivas de TBPA. BAAR positivo con Cultivo positivo o negativo a MTB; o BAAR negativo con Cultivo MTB positivo; o bien, BAAR o Cultivo MTB negativos con PCR IS6110 positivo.

3.2. Subgrupo de individuos sin DM2: En este grupo, los criterios de inclusión son los mismos que para el grupo de pacientes con DM2, exceptuando el criterio de padecer DM2, de acuerdo a los criterios de la ADA referidos anteriormente.

En la figura 2 se muestran los grupos y subgrupos clínicos que integran los diferentes pacientes e individuos sanos con base en los criterios de selección establecidos.

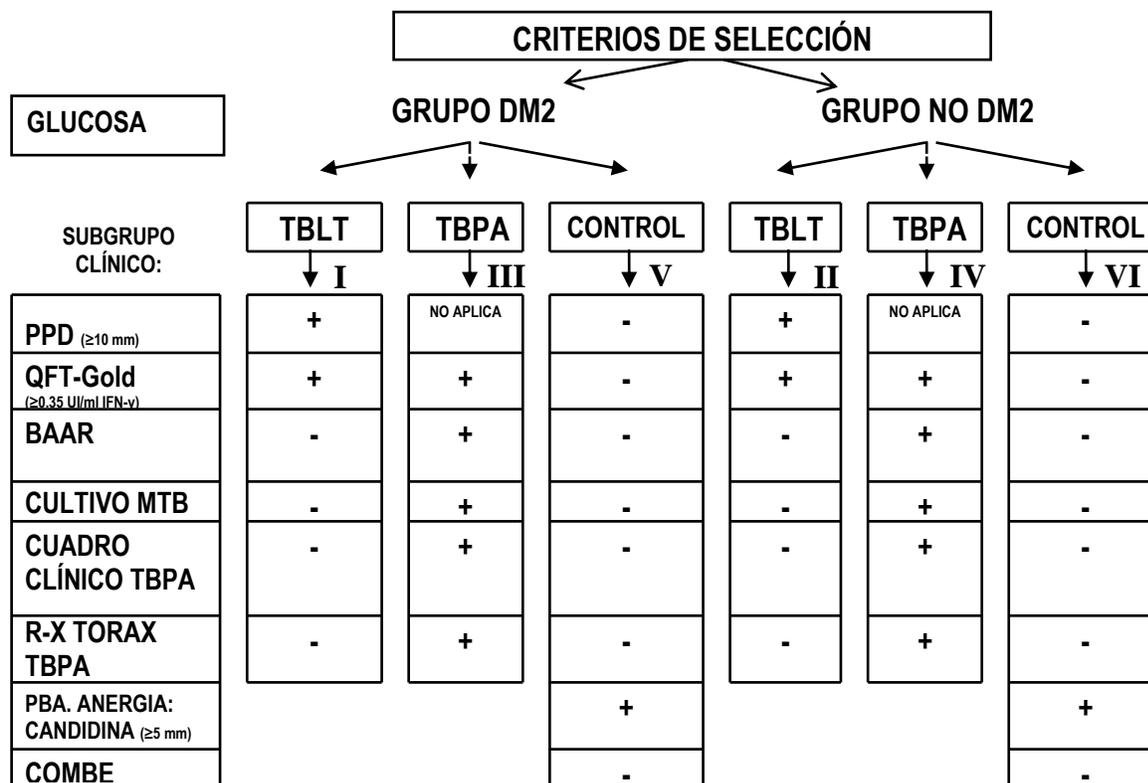


Figura 2. Grupos y subgrupos clínicos que integran los diferentes individuos con base en los resultados de los criterios de selección.

V.3.4 Obtención del material biológico. Para la obtención del material biológico se involucró a dos equipos de trabajo de campo. El primer equipo perteneciente a la Unidad de Investigación Médica en Zacatecas; se conformó por 4 enfermeras, un químico, un licenciado en Salud Pública y un médico infectólogo. El segundo equipo estuvo integrado por una enfermera, una química y un médico, pertenecientes a la Unidad de Investigación Biomédica de Durango; ambas unidades pertenecen al Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS). El material biológico se obtuvo de todos los individuos que cubrieron los criterios de selección, a los cuales se les realizó los siguientes estudios: las pruebas de la tuberculina (PPD) y del QuantiFERON-Gold® para identificar infección por MTB; se les realizó también estudios de biometría hemática y química sanguínea completas; la prueba de la candidina para estudiar anergia; BAAR y cultivo de MTB, así como la toma de una placa radiológica de tórax para determinar si presentan o no imagen sugestiva a TBPA.

A todos los individuos se les tomó muestras de sangre periférica en tubos PAXgene (PreAnalytiX, GmbH, Switzerland). Se tomaron dos tubos Vacutainer™ adicionales (uno sin anticoagulante y el otro con EDTA) con el fin de conformar una seroteca y material celular de cada individuo, mismos que servirán para realizar estudios inmunológicos y genómicos en proyectos futuros.

V.3.5. Recolección, estabilización, y conservación de las muestras sanguíneas. A los individuos que reunieron los criterios de selección, se les tomaron muestras de sangre periférica en 3 tubos PAXgene (PreAnalytiX, GmbH, Switzerland) los cuales pueden contener hasta 2.5 ml de sangre por tubo. La sangre se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces, para después incubarse a temperatura ambiente por 2 h como mínimo. Posteriormente se congelaron a -20°C durante toda la noche y, por último, se conservaron a -80°C hasta su uso.

V.4. Extracción de RNA total. Las muestras sanguíneas contenidas en los tubos PAXgene y conservadas a -80°C se descongelaron durante toda la noche en un refrigerador a $4-8^{\circ}\text{C}$, para posteriormente incubarse por 2 h a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se procedió a realizar la extracción y purificación del RNA total utilizando el sistema de extracción "PAX gene Blood RNA kit" (PreAnalytiX, GmbH, Switzerland) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En términos generales, el aislamiento del RNA se inició con un paso de centrifugación a $3,500 \times g/15$ min para formar un botón de leucocitos en el fondo del tubo. El botón se lavó, se resuspendió y se incubó en amortiguadores optimizados conteniendo proteinasa K para la digestión de las proteínas a $55^{\circ}\text{C}/10$ min en un bloque calefactor con agitación (Thermomixer Confort; Eppendorf) a 1400 rpm. Se realizó una centrifugación a $13,000 \times g/3$ min para eliminar el detritus celular mediante el uso de una columna de disgregación y el sobrenadante se transfirió a un microtubo de $1.5 \mu\text{l}$ libre de RNasas y DNasas (Axigen Scientifics, USA); se adicionó $350 \mu\text{l}$ etanol absoluto para ajustar las condiciones de unión del RNA, y el lisado se transfirió a una columna de extracción de RNA. Durante una breve centrifugación a $1,200 \times g/2$ s, el RNA es unido en forma selectiva a la membrana de silica-gel de la columna, mientras que los contaminantes pasan a través de ella. Los contaminantes residuales se eliminaron en tres pasos subsecuentes de lavado; entre ellos, el DNA genómico fue eliminado mediante la digestión en columna utilizando $80 \mu\text{l}$ de una solución de DNasa I libre de RNasas (Qiagen, Inc. USA). El RNA total puro se eluyó en dos pasos de centrifugación a $13,000 \times g/1$ min con $40 \mu\text{l}$ con la solución BR5 (H_2O libre de RNasas) cada uno, para después realizar un paso de desnaturalización por calor a $65^{\circ}\text{C}/5$ min. La concentración de las muestras de RNA obtenidas y su grado de pureza se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA), mientras que la

integridad se determinó mediante corrimientos electroforéticos en geles nativos de agarosa al 1.2% a 100V/45 min y teñidos con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.05 µg/ml.

Después de estas pruebas y con el fin de mantener la integridad del RNA, se adicionaron a cada muestra, 80 U (2 µl) del inhibidor de RNAsas "RNAsin" (Promega, Inc. USA). Todas las muestras obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

V.5. Concentración y enriquecimiento del RNA. Para lograr una concentración adecuada del RNA purificado y poder realizar los pasos siguientes, las muestras obtenidas a partir de 2 tubos PAXgene se concentraron y enriquecieron mediante el uso del sistema "RNeasy MiniElute CleanUp" (QIAGEN, Inc., USA), el cual utiliza columnas que contienen una membrana de sílica-gel la cual permite enriquecer las muestras de RNA con concentraciones de menos de 200 µg/ml (2 µg/10 µl), además que permite la eliminación de moléculas de RNA menores de 200 nucleótidos (tRNA, 5S rRNA y 5.8S rRNA), lo cual resulta en una muestra de RNA enriquecida. Las muestras de RNA total de los individuos mencionados se concentraron a un volumen final de 12 µl a partir de un volumen inicial de 160 µl.

V.6. Eliminación de transcritos de globina. Ya que el alto contenido de transcritos de genes de globina en las muestras de RNA total extraídas a partir de sangre completa disminuye la sensibilidad de detección de un número importante de genes durante la hibridación a los microarreglos, se realizó la eliminación de dichos transcritos utilizando para ello el sistema "GLOBINclear-Human" (Ambion Inc. USA). En términos generales, para la eliminación de transcritos de globina de las muestras de RNA concentradas de tres donadores sanos, se utilizó una cantidad estándar de 2.0 µg, lo cual cae en el intervalo recomendado de 1-10 µg contenidos en un volumen no mayor de 12 µl. Este procedimiento permite remover > 95% de los mRNA de globina α y β. Para ello, el RNA total se mezcló con una solución de oligonucleótidos de captura biotinilados específicos para los mRNAs de globina de humano. La mezcla se incubó para permitir que los oligonucleótidos biotinilados se hibridaran con los mRNAs de globina. La captura se hizo mediante el uso de perlas magnéticas-estreptavidina y una incubación posterior a 37°C.

Durante esta incubación, la estreptavidina se unió a los oligonucleótidos biotinilados, capturando los mRNAs de globina en las perlas magnéticas. El RNA así procesado, se purificó posteriormente mediante el uso de perlas magnéticas. Este paso consistió en la adición de una suspensión de perlas magnéticas que atrapan al RNA permitiendo, mediante captura magnética, el lavado y la elusión del RNA libre de transcritos de globina.

V.7. Amplificación y marcaje de RNA libre de transcritos de globina. De acuerdo a las instrucciones del fabricante para realizar los ensayos de amplificación del RNA, es posible utilizar de entre 50 hasta un máximo de 5,000 ng de RNA, en un volumen máximo de 10 μ l. En los experimentos de estandarización para las muestras de RNA de tres donadores sanos, se usaron 200 ng de RNA, equivalente a 5.0 μ l de la solución de RNA libre de transcritos de globina; como control positivo se usó 1.0 μ l (1 μ g) de RNA control de células HeLa; en las muestras experimentales se usaron sólo 100 ng de RNA libre de transcritos de globina.

Para la amplificación y marcaje del RNA se utilizó el sistema "MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Single Round aRNA Amplification" (Ambion Inc. USA). Este sistema se basa en el método desarrollado por el grupo de James Eberwine (65) el cual consiste en una transcripción inversa que utiliza un oligo (dT) con el promotor T7, usando la transcriptasa inversa "ArrayScript™" diseñada para producir rendimientos más elevados de la primera cadena del cDNA, en relación con las transcriptasa silvestre. Esta transcriptasa inversa "ArrayScript™", cataliza la síntesis de virtualmente cualquier longitud del cDNA, lo cual es la mejor estrategia para asegurar la detección de todas las moléculas de mRNA contenidas en las muestras de RNA para los estudios de microarreglos de expresión. La cadena de cDNA se sometió posteriormente a la síntesis de la segunda hebra mediante la acción de la DNA polimerasa I, para convertirse en un molde y que la T7 RNA polimerasa "MEGAscript®" lleve a cabo la transcripción inversa *in vitro* (IVT). Ya que cada molécula de cDNA de doble cadena contiene un promotor T7, es posible que grandes cantidades de RNA antisentido (aRNA o cRNA) puedan ser sintetizadas a partir de la mezcla del cDNA con la T7 RNA polimerasa "MEGAscript®".

Para maximizar el rendimiento del cRNA amplificado y marcado con biotina, se utilizó una mezcla optimizada de NTPs marcados y no marcados con biotina. En cada ciclo de amplificación del procedimiento de Eberwine se producen alrededor de 100 veces más la cantidad de RNA inicial, lo cual permite incrementar la posibilidad de detección de especies raras de mRNA contenidas en la muestra de RNA. Una vez purificado, el cRNA marcado con biotina se usó en el sistema de microarreglos de expresión del presente estudio.

Para realizar el procedimiento de estandarización, tanto la muestra de RNA control como las muestras de RNA experimentales, fueron sometidas al proceso de amplificación y marcaje, incubando las reacciones de IVT a 37 °C/14 h.

V.8. Fragmentación del cRNA-biotina. Con el propósito de incrementar la cinética de la reacción de hibridación y reducir la posibilidad de la formación de estructuras secundarias, fue necesario someter a una fragmentación a las muestras de cRNA marcadas con biotina (cRNA-biotina), la cual se realizó durante la

incubación en el paso de prehibridación. En general, fragmentos de entre 50 y 200 bases maximizan la unión específica y la sensibilidad de detección.

Los ensayos de fragmentación del cRNA-biotina se realizaron de acuerdo a los protocolos específicos para la hibridación y detección de la imagen de los microarreglos CustomArray 4x2k de CombiMatrix (CombiMatrix, Mukilteo, Wa, USA), la cual consiste en una reacción de hidrólisis metal-inducida, utilizando el regulador de fragmentación 5x incluidos en el sistema "MessageAmp™ II-Enhanced Single Round aRNA Amplificación", la cual contiene: Tris acetato, pH 8.2 (200 mM), acetato de potasio (500mM) y acetato de magnesio (150 mM). La fragmentación se realizó en un Thermomixer Comfort, marca "Eppendorf" a 95°C por 20 min e inmediatamente después se puso en hielo.

Para visualizar los tamaños de los fragmentos de las moléculas de cRNA-biotina se realizó una separación electroforética en gel de agarosa nativo al 2% con amortiguador TBE1X a 100 V/45 min, para posteriormente realizar una tinción con una solución de bromuro de etidio al 0.05%; como marcador de tamaño molecular se utilizó una escalera de DNA de 100 bp. Se incluyó una muestra de cRNA-biotina sintetizada a partir de una muestra de RNA control (células HeLa). La imagen resultante se procesó en un lector GeneGenius (Synoptics, UK).

La cantidad de cRNA-biotina fragmentado que se utilizó para hibridar cada uno de los sectores del microarreglo 4X2K CustomArray fue de 1.0 µg. Esta cantidad debe estar contenida en un volumen máximo de 5.6 µl, para que junto con la solución de fragmentación 5x, se obtenga un volumen total de 7.0 µl. Este volumen del cRNA-biotina fragmentado, junto con los respectivos volúmenes de reactivos que se utilizan para realizar la hibridación (2X solución stock de hibridación, formamida DI, DNA de esperma de salmón, SDS al 1%, y agua libre de RNasas), deben dar un volumen final total de 35 µl, mismo que se utilizó para llenar cada sector de la cámara de hibridación del microarreglo.

En la tabla 2 se indican los volúmenes utilizados de los diferentes componentes de la reacción de fragmentación de las muestras de cRNA-biotina marcadas necesarios para llevar a cabo la hibridación de 1 sector del chip (el volumen de cada muestra de cRNA-biotina depende del rendimiento obtenido en la síntesis de cada una de ellas).

Tabla 2. Reactivos y volúmenes requeridos para la fragmentación del cRNA-biotina para hibridar 1 sector del microarreglo CustomArray 4x2k de CombiMatrix.

Reactivo	cRNA-biotina 1	cRNA-biotina 2	cRNA-biotina 3	cRNA-biotina control
H ₂ O libre RNasas	1.3 µl	2.7 µl	3.1 µl	4.2 µl
Solución de fragmentación 5X	1.4 µl	1.4 µl	1.4 µl	1.4 µl
cRNA-biotina	4.3 µl	2.9 µl	2.5 µl	1.4 µl
Vol. total	7.0 µl	7.0 µl	7.0 µl	7.0 µl

V.9. Hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k de CombiMatrix. Los ensayos de hibridación a los microarreglos de expresión de las muestras de cRNA amplificadas y marcadas con biotina de los diferentes individuos que conforman el estudio, se realizaron de acuerdo a los protocolos específicos para la hibridación y detección de la imagen de los microarreglos CustomArray 4x2k de CombiMatrix (CombiMatrix, Mukilteo, Wa, USA). En primer lugar, fue necesario determinar la sensibilidad de hibridación de los microarreglos CustomArray 4x2k.

V.9.1. Determinación de la sensibilidad de hibridación del microarreglo. Se determinó la sensibilidad del ensayo de hibridación al microarreglo, con el propósito de establecer la cantidad mínima de transcritos de *Arabidopsis thaliana* (Spike controls) en la que se pueda observar una señal óptima de hibridación; dicha cantidad de “Spike controls” o salpicados es la que agregó a las muestras de RNA libre de transcritos de globina de los individuos que conforman los diferentes grupos clínicos para llevarse a cabo la reacción de amplificación y marcaje en forma simultánea; es decir, tanto la amplificación de los transcritos de *Arabidopsis thaliana*, como de los mRNAs de las muestras problema. Esta mezcla de transcritos se hibridó posteriormente a los microarreglos CustomArray 4x2k.

Para realizar lo anterior, se utilizaron las siguientes “Spike controls” de *A. thaliana* (RNA poliadenilado transcrito *in vitro*; 10 ng/µl en H₂O libre de nucleasas) (Stratagene, Inc. USA), los cuales son de secuencia complementaria a las tres sondas incluidas en el diseño del microarreglo, consideradas como controles positivos heterólogos: 1) Spot Report mRNA Spike 2: RCA; *Arabidopsis thaliana* RUBISCO activase (513 bp) (GeneBank® database accession #X14212); 2) Spot Report mRNA Spike 4: LTP4; *Arabidopsis thaliana* lipid

transfer protein 4 (527 bp) (GeneBank® database accession #AF159801); y 3) Spot Report mRNA Spike 6: XCP2; *Arabidopsis thaliana* papain-type cystein endopeptidase (507 bp) (GeneBank® database accession #AF191028).

Considerando una cantidad inicial de 50 ng de cada uno de los tres “Spike controls”, se hizo una dilución inicial 1:1000 para tener una concentración de 50 pg/μl, a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas con base a 2, hasta tener una cantidad final de 0.0056 pg. Con el propósito de incrementar la estabilidad de las bajas concentraciones obtenidas de mRNA de *Arabidopsis thaliana*, las diluciones se hicieron en H₂O libre de nucleasas conteniendo tRNA de levadura a una concentración de 10 ng/μl .

Se agregó 1 μl de diferentes diluciones de los tres “Spike controls” a la reacción de amplificación y marcaje a la que se sometieron varias alícuotas conteniendo 200 ng de RNA libre de transcritos de globina provenientes de un individuo sano perteneciente al grupo NO DM2/CONTROL; se utilizó como control positivo la misma cantidad de RNA control proveniente de células HeLa. Varias de las muestras de aRNA amplificadas y marcadas con biotina conteniendo diferentes cantidades de los tres “Spike controls”, se hibridaron a diferentes sectores de algunos microarreglos CustomArray 4x2k. Se determinó en cual dilución, conteniendo la mínima cantidad de “Spike controls”, se observó una clara señal de hibridación sin llegar a valores de saturación.

V.9.2. Prehibridación. En primer lugar, los microarreglos CustomArray 4x2k se ensamblaron en las cámaras de hibridación, incluyendo los capuchones sectorizadores. Ya que los microarreglos se proveen secos, éstos se rehidrataron mediante la adición de 35 μl de H₂O libre de nucleasas a cada uno de los 4 sectores de los microarreglos e incubando a 65°C/10 min. Posteriormente se realizó un paso de prehibridación de los microarreglos para bloquear las uniones inespecíficas de los ácidos nucleicos blanco, mediante la adición de una solución de prehibridación e incubados a 45°C/30 min en un horno de hibridación con rotación suave.

V.9.3. Hibridación. Cada sector del microarreglo se llenó con 30 μl de la solución de hibridación (Solución stock de hibridación 2k, formamida DI, DNA de esperma de salmón desnaturalizado, SDS 1% y la correspondiente muestra de aRNA-biotina fragmentada). Posteriormente, los microarreglos se incubaron a 45°C/16 h en un horno de hibridación con rotación suave. Como replicado técnico, se utilizaron dos sectores de un microarreglo CustomArray 4x2 k por individuo.

V.9.4. Lavados y marcaje posthibridación. Se realizaron varios pasos de enjuague con diferentes soluciones de lavado (6X SSPET, 3X SSPET, 0.5X SSPET, PBST y PBS). Se agregó una solución

bloqueadora de biotina para evitar señales inespecíficas (10X PBS, Tween-20, y BSA acetilado); posteriormente, se realizó la reacción de marcaje de biotina mediante la adición de una solución compuesta por el fluoróforo CY5 unido a estreptavidina. Después de un lavado final, se procedió a llevar a cabo la lectura de los microarreglos.

V.10. Lectura de los microarreglos CustomArray 4x2k de CombiMatrix. Una vez que se removieron los microarreglos de la cámara de hibridación, se cubrió el área del semiconductor de los microarreglos con una solución especial de lectura compuesta por fosfatos, después se colocó sobre éste un portaobjeto especialmente diseñado para este tipo de chips. Para realizar la lectura de los microarreglos se utilizó el escáner GenePix 4100A y el software GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments, Inc, USA). Se determinó la ganancia óptima del PMT (tubo fotomultiplicador) a una longitud de onda del láser de 635 nm; las imágenes obtenidas se guardaron en archivos tipo TIFF.

V.11. Análisis de la imagen resultante y extracción de los datos de hibridación. Para llevar a cabo tanto el análisis de la imagen resultante después del escaneo, como la extracción de los valores de las señales de hibridación, se utilizó el programa "CombiMatrix Microarray Imager Software". En primer lugar, se ajustó una plantilla de lectura sobre el área en donde se ubican los microelectrodos que contienen las sondas de oligonucleótidos hibridados con el fin de medir las señales de fluorescencia emitidas. Después, aquellos microelectrodos que tuvieran artefactos se marcaron y eliminaron para no ser considerados al momento de la extracción de los datos. Los datos extraídos se recuperaron en un archivo TXT y se guardaron en un archivo de Excel.

V.12. Análisis de los datos obtenidos por microarreglos. Para realizar el análisis de los datos obtenidos en los ensayos de microarreglos, se utilizó el programa SAM 1.15 (Statistical Analysis of Microarrays) establecido en 2001 por Tusher, Tibshirani and Chu del departamento de Bioquímica de la Universidad de Stanford, Standford, CA, USA, el cual utiliza el sistema estadístico "R" que permite identificar genes diferencialmente expresados con significancia estadística en experimentos de microarreglos.

SAM correlaciona los datos de expresión genética con una amplia variedad de parámetros clínicos o condiciones experimentales y proporciona un estimado de la tasa de resultados falsos o FDR (False Discovery Rate) para el análisis de datos múltiples; además, realiza un análisis estadístico para cada gene midiendo el nivel de relación entre la expresión genética y la condición experimental estudiada llevando a cabo permutaciones repetidas de los datos (Bootstrap analysis) para así determinar si la expresión de cierto gene

está relacionada en forma significativa con determinada respuesta. El programa usa pruebas estadísticas no paramétricas, ya que los datos pueden no seguir una distribución normal (67).

En primer lugar se realizó la normalización de los datos obtenidos de las señales de hibridación de los chips hibridados correspondientes a los 6 subgrupos clínicos, usando regresión múltiple de los valores promedio de cada grupo de datos obtenidos. Una vez hecha la normalización, los valores de los datos de cada grupo control se sustrajeron de los valores de los datos de los grupos experimentales; es decir, los valores de expresión obtenidos del grupo NO DM2/CONTROL se sustrajeron de los valores obtenidos de los subgrupos NO DM2/TBLT y NO DM2/TBPA. De igual forma, los valores de expresión obtenidos del subgrupo DM2/CONTROL se sustrajeron de los valores obtenidos de los subgrupos DM2/TBLT y DM2/TBPA. Posteriormente, estos valores se ajustaron a un formato adecuado en Excel para ingresarlos al programa SAM, el cual identificó los grupos de genes inducidos y reprimidos con valor estadístico significativo en los diferentes subgrupos clínicos.

Los parámetros y valores utilizados en SAM fueron los siguientes: a) Tipo de datos: dos clases de datos no pareados; b) Valor de Delta: 0.3; c) Cambio mínimo en el nivel de expresión: 5; d) Número de permutaciones: 100; e) Prueba estadística: estándar (*T*-statistic value); f) Datos a escala logarítmica: no; g) Cálculo de la tasa de resultados falsos o FDR (False Discovery Rate): sí. Esta tasa es representada por el valor- *q* (valor similar al valor-*p*) y es el valor más bajo en el cual el gene es considerado como significativo. Un valor de $p = 0.01$ es significativo en el contexto de experimentos diseñados para evaluar un pequeño número de genes, pero pudiendo no ser significativo en experimentos en donde se analiza a un gran número de genes, como es en el caso de los microarreglos. El valor-*q* mide qué tan significativo es determinado gene; entre más este valor se acerque a 0, el gene es más significativo estadísticamente.

De tal forma, que de la lista de genes positivos o sobreexpresados con significancia estadística generados por el programa SAM, tanto en el subgrupo de pacientes NO DM2/TBPA como del subgrupo DM2/TBPA, se seleccionaron sólo aquellos genes con valores de $0 \leq 1$, es decir, con un alto grado de significancia estadística.

Con el fin de visualizar la distribución y la forma en la que se agrupan, tanto los genes con niveles similares de expresión, como los diferentes experimentos o pacientes estudiados, se utilizó el programa Cluster and TreeView 1.60" (Michael Eisen; Stanford University, CA, USA), el cual realiza un análisis gráfico de los resultado; dichas agrupaciones son representados en los dendogramas respectivos de la gráficas generadas.

Para determinar, entre otros datos, la función y el o los procesos biológicos en los que están involucrados los genes finalmente identificados con niveles de expresión distintivos en los subgrupos clínicos de pacientes NO DM2/TBPA y DM2/TBPA, se utilizó la base de datos "SOURCE" de la Universidad de Stanford, CA, USA (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>).

V.13. Validación de los resultados obtenidos por microarreglos mediante RT-PCR en tiempo real.

Para comprobar y cuantificar los valores de expresión de los genes identificados por microarreglos, se utilizó el método de cuantificación relativa mediante RT-PCR en tiempo real, en el cual, la cuantificación de la expresión de un determinado gene se hace en relación a un gene constitutivo de referencia y, en contra del cual, el nivel de expresión del gene problema puede ser normalizado. Con esta normalización es posible corregir problemas debidos a variaciones en la cantidad inicial de la muestra, variaciones en la recuperación de los ácidos nucleicos, la posible degradación del RNA de la muestra, diferencias en la calidad de la muestra y/o ácido nucleicos, variaciones en la muestra por error de pipeteo, así como a variaciones en la eficiencia en la síntesis del cDNA.

En el presente estudio se utilizó el modelo matemático descrito por Michael W. Pfaffl en el 2001 para calcular la relación de la expresión relativa de los genes, el cual utiliza el valor de la eficiencia de los ensayos de RT-PCR en tiempo real (E) y el valor de CP (crossing point) de los genes problema, en relación al gene constitutivo de referencia usado; E es la eficiencia de la RT-PCR en tiempo real de un ciclo de amplificación en la fase exponencial y CP es el punto en el cual la fluorescencia se eleva en forma perceptible por arriba de la fluorescencia de fondo. Este modelo no requiere de curvas de calibración (68).

Se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real a las muestras de RNA libre de transcritos de globina de los 60 individuos que conforman la población de estudio, los cuales incluyen pacientes con y sin DM2. Se analizaron 10 de los 11 genes que finalmente se identificaron por microarreglos, los cuales podrían servir como posibles genes predictores de progresión a TBPA en ambos grupos de pacientes.

En el estudio se incluyeron 3 muestras sanguíneas más correspondientes a dos pacientes con DM2 (incluidos en los ensayos de microarreglos) con manifestaciones clínicas sugerentes de progresión a TBPA. Estas fueron:

a) Paciente 1. Paciente con TBLT en progresión sugestiva a TBPA de acuerdo a perfiles de expresión identificados en el estudio de microarreglos. Este paciente fue ubicado por el programa "Cluster TreeView" en un subclúster localizado entre los subgrupos de pacientes DM2/TBLT y DM2/TBPA, lo cual hizo sospechar que, a pesar de que inicialmente el paciente reunió los estrictos criterios de selección para este subgrupo

clínico, a nivel molecular quizá ya existía una huella digital transcripcional relacionada con progresión a TBPA. Por tal motivo, para los ensayos de RT-PCR en tiempo real se incluyó una alícuota de la primer muestra de RNA de este paciente (clave: 43-DM2/TBPA: registro qRT-PCR: P8), que se utilizó en los experimentos de microarreglos ubicada en el subgrupo DM2/TBLT, así como de una segunda muestra sanguínea (registro qRT-PCR: P61) tomada 2 años y 2 meses después de la primera toma con el fin de verificar dicha observación.

b) Paciente 2. Paciente que en el transcurso del presente trabajo progresó de TBLT a TBPA y el cual se incluyó en el subgrupo DM2/TBPA del estudio de microarreglos (clave: 55-DM2/TBPA; registro qRT-PCR: P23). La primera de las dos muestras del paciente (registro qRT-PCR: P62) se tomó 1 año y 4 meses antes de establecerse el diagnóstico de TBPA; en esta fecha el paciente ya había sido excluido como candidato del subgrupo DM2/TBLT porque a pesar de reunir todos los criterios de selección preestablecidos para dicho subgrupo clínico, ya presentaba una imagen anormal de tórax sugestiva de TBPA sin presentar aún ninguna sintomatología clínica, motivo por el cual se pensó que en ese momento el paciente posiblemente ya presentaba una huella transcripcional característica de progresión a TBPA. La segunda muestra sanguínea se tomó seis meses después de que el paciente terminó el tratamiento con antifímicos (registro qRT-PCR: P63) con el objeto de conocer cuál sería el perfil transcripcional en estas condiciones.

V.13.1. Determinación del gen constitutivo de referencia. Con el objeto de comprobar y cuantificar mediante RT-PCR en tiempo real la expresión de los genes identificados por microarreglos, se definió en primer lugar, el gen constitutivo que presentara menor variación en su expresión entre los 36 individuos de los 6 subgrupos clínicos que sirviera como gen de referencia. Para tal fin, se realizó un análisis de los 44 genes constitutivos que se incluyeron en el diseño del microarreglos 4X2K de CombiMatrix como controles positivos autólogos de hibridación, en donde se calculó el promedio de expresión de las tres secuencias que interrogaron a cada uno de estos genes en los experimentos de hibridación por microarreglos. Se determinó la desviación estándar de cada uno de ellos y se seleccionó a los genes que presentaron menor variación en los niveles de expresión en los 36 individuos que integraron el estudio.

V.13.2. Diseño y síntesis de iniciadores. Los iniciadores óptimos para realizar la amplificación mediante RT-PCR en tiempo real de los genes problema, fueron diseñados empleando la plataforma “ProbeFinder” disponible en línea por Roche Diagnostics. (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>). El diseño de los iniciadores cumplió con los siguientes parámetros: Tm

entre valores de 59-61 °C; contenido de GC de 36-63%. La escala de síntesis fue de 50 mM (Roche, Inc. USA).

V.13.3. Purificación de iniciadores. Después de centrifugar los tubos conteniendo los iniciadores a 14,000 x g/1 min, éstos se resuspendieron en 200 µl de H₂O milliQ mezclando perfectamente por 5-10 s con el vortex. Los tubos se centrifugaron para depositar el contenido en el fondo del tubo y transferir completamente la suspensión a otro tubo estéril. Los iniciadores se precipitaron adicionando 20 µl de acetato de sodio 3M mezclándolo perfectamente, para posteriormente adicionar 700 µl de etanol absoluto frío. El contenido se mezcló invirtiendo cada tubo al menos 8 veces. Los tubos con los iniciadores se colocaron a -70°C/1 h y luego se centrifugaron a 14,000 x g/10 min. El sobrenadante se descartó cuidadosamente evitando tocar el botón. El botón se lavó con 100 µl de etanol al 70 % v/v, mezclando por inmersión 3 veces y se centrifugaron a 14,000 x g/5 min. Se descartó el sobrenadante sin tocar el botón y se dejó secar a 40°C/5 min, para posteriormente resuspender en 50 µl de H₂O milliQ. Por último, los iniciadores ya purificados se cuantificaron tomando 2 µl de cada solución al diluir el stock en 198 µl de H₂O milliQ; se obtuvieron las lecturas a 260/280 nm en el NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA). Por último, se prepararon soluciones de trabajo con una concentración de 20 µM cada una.

V.13.4. Síntesis del cDNA. La síntesis del cDNA se realizó por transcripción inversa utilizando el RNA libre de transcritos de globina obtenido de los 63 individuos antes descritos. Se empleó el sistema SuperScript™ II reverse Transcriptase (Invitrogen). Se calculó el volumen que contuviera 250 ng de RNA libre de transcritos de globina de los diferentes individuos y a cada una de estas muestras se le agregó 1µl del iniciador de secuencias múltiples (random primer oligonucleotide), 1µl de oligo (dT) y 1 µl dNTP's y se ajustó a un volumen final de 12 µl con H₂O libre de RNasas, incubándose a 65°C/5 min para posteriormente colocarse en hielo. A cada una de las muestras se les agregó 6 µl de una mezcla compuesta por "5X first strand buffer" y DTT al 0.1 M (4 µl y 2 µl respectivamente). El tubo de reacción se incubó a 25°C/2 min (temperatura ambiente) y se agregó 1 µl de la enzima SuperScrip II a cada muestra. La mezcla se incubó primero a 25°C/10 min y posteriormente a 42°C/50 min. Se inactivó la reacción a 70°C/15 min. A cada una de las muestras se le agregó 1 µl de RNasa "H", incubándose posteriormente a 37°C/20 min con el fin de remover el RNA complementario al cDNA. Por último, el cDNA obtenido se cuantificó mediante el uso del NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA).

V.13.5. Rango dinámico. Con el objeto de asegurar que el sistema de amplificación funcionara correctamente, tanto para el gene constitutivo de referencia como para los 10 genes problema a investigar, y

poder así detectar señales de amplificación en todas las muestra problema, se determinó la cantidad óptima de cDNA a utilizar para los ensayos de amplificación. Para ello se obtuvo el punto de inicio de la amplificación o “crossing point” (CP) de todas las muestras de cDNA de los pacientes, buscando que hubiera un adecuado nivel de detección para los 10 genes estudiados.

Inicialmente se obtuvo un rango dinámico para el gene constitutivo de referencia utilizando muestras de cDNA de pacientes de diferentes subgrupos clínicos de la siguiente manera: a partir de una cantidad inicial de 40 ng/μl de cDNA se hizo una serie de diluciones 1:2 en H₂O libre de RNasas hasta obtener una concentración final de 1.25 ng/μl (dilución final 1:32); la reacción de amplificación se llevó a cabo por triplicado. Posteriormente, y con el propósito de contar con un control positivo de reacción, se generó una mezcla de muestras (pool) de cDNA de pacientes con TBLT y TBPA con y sin DM2, en los cuales los 10 genes a investigar presentaban niveles elevados de expresión de estos genes, de acuerdo a los resultados de microarreglos. En seguida, se midió el rango dinámico, utilizando dicho control positivo, para cada uno de los 10 genes problema, con el fin de asegurar la detección de la amplificación de dichos genes, utilizando solamente las concentraciones de cDNA de 10 ng/μl y 5 ng/μl en un volumen de 2.0 μl determinadas previamente con el gene de referencia.

V.13.6. Ensayos de amplificación. Los niveles de expresión de los 10 genes discriminantes y del gene de referencia se midieron por triplicado, incluyendo un control positivo y uno negativo por cada paciente. Se empleó la mezcla de reacción “LightCycler TaqMan Master Mix” que emplea sondas de hidrólisis y la biblioteca de sondas de humano “Universal Probe library Set” (Roche, diagnostics GMBH, Germany); para los ciclos de amplificación se usó el termociclador “LightCycler 2.0” (Roche, Inc USA).

Para la amplificación se consideró una cantidad inicial de 50 ng de cDNA de las muestras problema y de 10 ng de cDNA del “pool” de controles positivos, contenidos ambos en un volumen final de 2.0 μl. Se preparó la mezcla de reacción de PCR “Master Mix” que incluyó H₂O libre de RNasas, la sonda e iniciadores sentido y antisentido correspondientes al gen a amplificar, así como la Taq polimerasa “Hot Start disuelta en la mezcla de reacción PCR” (FastStart Taq DNA Polymerase, buffer de reacción, MgCl₂ y mezcla de dNTPs (con dUTP en lugar de dTTP). Posteriormente, al capilar LightCycler se le agregaron 8.0 μl de esta mezcla y 2.0 μl de la muestra de cDNA; se preparó volumen suficiente para realizar 5 reacciones de amplificación (tres replicados para el gene problema, 1 para el control positivo y 1 para el control negativo); como control negativo se utilizó la misma cantidad de la mezcla maestra de reacción de PCR “Master Mix” sustituyendo el

cDNA por H₂O libre de RNasas (tabla 3). Por último, se llevó a cabo a cabo la reacción de amplificación con los siguientes parámetros: lectura a longitud de onda 530 nm y 45 ciclos de amplificación (tabla 4).

Tabla 3. Mezcla de reacción para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Reactivo	Vol. para 1 reacción (µl)	Vol. para 5.5 reacciones (µl)
H ₂ O	5.7	31.3
“TaqMan Master mix” 5X	2.0	11.0
Mezcla de iniciadores (10 µM c/u)	0.2	1.10
Sonda	0.1	0.55
cDNA (pacientes: 25 ng/ µl; pool de controles: 5 ng/ µl).	2.0	2.0

Tabla 4. Programa de amplificación del termociclador LightCycler 2.0.

Ciclos	Modo de Análisis	Temperatura	Tiempo	Modo de Adquisición
1	Ninguno	<u>Preincubación</u> (95°C)	10 min	Ninguno
45	Cuantificación	<u>Amplificación</u> Desnaturalización (95 °C)	10 s	Ninguno
		Alineación (60 °C)	30 s	Ninguno
		Extensión (72 °C)	1 s	Ninguno
1	Ninguno	<u>Enfriamiento</u> (40 °C)	30 s	Ninguno

V.13.7 Cálculo de la expresión relativa de los genes analizados. Para calcular la expresión relativa de cada uno de los 10 genes problema se usó el valor promedio del valor de CP obtenidos durante la reacción de PCR de los tres replicados de cada paciente. Esto se llevó a cabo normalizando los valores promedio de CP de los genes, tanto de los pacientes de los subgrupos problema, como de los pacientes de los subgrupos control, en relación con los valores de CP del gene *constitutivo* de cada individuo, con lo cual se compensa las variaciones que pudiesen haber ocurrido entre las diferentes corridas de amplificación. Se empleó la siguiente fórmula:

$$Expresion\ Relativa = \frac{(E_{gen\ problema})^{\Delta CP_{gen\ problema\ (control-paciente)}}}{(E_{gen\ constitutivo})^{\Delta CP_{gen\ constitutivo\ (control-paciente)}}$$

La $E_{gen\ problema}$ es la eficiencia de amplificación por RT-PCR en tiempo real del gen *problema* y la $E_{gen\ constitutivo}$ corresponde a la eficiencia de amplificación del gen *constitutivo*. $\Delta CP_{gen\ problema}$ es el promedio del valor de CP del subgrupo control, menos el promedio del valor de CP del gen *problema* de cada paciente; $\Delta CP_{gen\ constitutivo}$ promedio del valor de CP del gen constitutivo, menos el promedio del valor de CP gen *problema* de determinado paciente.

La fórmula presentada combina dos modelos matemáticos: el primero de ellos es el “Método matemático calibrado de la eficiencia para la expresión relativa por RT-PCR en tiempo real” (Roche Diagnostics), cuyos resultados son idénticos al modelo matemático descrito por Michael W. Pfaffl; el segundo, es el “Modelo delta-delta” (PE Applied Biosystem; Perkin Elmer, Forster City, CA), en el cual, se considera que la eficiencia de amplificación, tanto del gene *problema* como del gen *constitutivo*, es idéntico ($E=2$). Por lo tanto, en la fórmula de expresión relativa utilizada se puede considerar como $E_{gen\ problema} = E_{gen\ constitutivo} = 2$ (68).

Para el cálculo de la expresión relativa de determinado gen *problema* de determinado paciente, se consideró tanto el valor del promedio de los tres replicados del CP de determinado gen *problema* del subgrupo control, menos el valor promedio de los tres replicados del CP del gen *problema* de cada paciente, así como el valor del promedio de los tres replicados del CP del gen *constitutivo* de subgrupo control, menos el valor promedio de los tres replicados del CP del gen *constitutivo* de cada paciente. De esta forma se elimina el valor basal de la expresión promedio de los individuos del subgrupo control del valor obtenido tanto del gen *problema* como del gen *constitutivo*. Estos valores corresponden al ΔCP del gen *problema* y del ΔCP del gen *constitutivo*, los cuales corresponden al valor de la potencia a la cual se eleva el valor de la eficiencia E de la RT-PCR en tiempo real ($E=2$), tanto del gen *problema* como del gen *constitutivo*; al dividir estos se obtiene la expresión relativa del gen analizado en determinado paciente.

En el caso del subgrupo control se asume un valor de expresión relativa de 1, ya que el valor de ΔCP tanto del gen *problema* como del gen *constitutivo* es de 0. Es decir, no existe diferencia entre el valor del gen *problema* del subgrupo control comparado contra él mismo, ni existe diferencia entre el valor del gen

constitutivo del subgrupo control comparado contra él mismo. Al substituir este el valor de 0 en la formula de la expresión relativa y considerando que tanto el gen *problema* como el gen *constitutivo* tienen un valor de $E=2$, entonces el valor de 2 elevado a la 0 potencia da un valor de 1 para el gen problema y para el gen constitutivo; dividiendo $1/1=1$; por lo tanto, el valor promedio de la expresión relativa del subgrupo DM2/CONTROL es de 1.

El valor de la eficacia en la amplificación, tanto del gen problema como del gen *constitutivo* ($E_{gen\ problema}$ y $E_{gen\ constitutivo}$) debe ser cercano al valor de 2 debido a que la amplificación debe incrementarse al doble en forma constante (log en base 2). Los valores obtenidos en las corridas de amplificación de nuestros ensayos fueron muy cercanos a 2, por lo que se consideró este valor como la eficacia en el ensayo (E) para todos los genes, incluyendo al gene *constitutivo*.

V.13.8. Determinación del poder discriminante de los genes identificados por microarreglos y analizados por RT-PCR en tiempo real.

V.13.9. Cálculo de la sensibilidad y especificidad de los genes. Se determinó el poder discriminante o exactitud diagnóstica de cada gene, es decir, su capacidad para clasificar correctamente a los pacientes en los grupos TBLT o TBPA.

La exactitud diagnóstica se expresa generalmente como la sensibilidad y la especificidad diagnóstica y se refiere al poder que tiene una prueba diagnóstica para clasificar o discriminar correctamente a los pacientes en categorías o estados en relación con la enfermedad (69); es decir, estar o no estar enfermo, respuesta negativa o positiva a la terapia, TBLT o TBPA, etc.

Cuando se utiliza una prueba dicotómica, es decir, cuando los resultados se puedan interpretar directamente como positivos o negativos, la sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como positivo respecto a la condición que estudia la prueba, razón por la que también es denominada fracción de verdaderos positivos. La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo; ésta es igual al resultado de restar a uno la fracción de falsos positivos.

Se calculó la sensibilidad y especificidad de 10 genes identificados inicialmente por microarreglos utilizando el programa Epidat 3.1 (Programa para el análisis epidemiológico de datos tabulados de la OPS/OMS; 2006), considerando los valores de expresión relativa obtenidos por RT-PCR en tiempo real en los 10 pacientes que conforman cada uno de los seis subgrupos clínicos estudiados, incluyendo los grupos NO DM2 y DM2 (ver tablas 17 y 18). La sensibilidad y especificidad de determinado gene se estimó clasificando

los datos de expresión relativa de cada paciente utilizando una tabla de asociación 2x2 respecto al resultado de la prueba y el estado de infección (TBLT o TBPA), considerando un intervalo de confianza del 95% (tabla 19). Además, en el cálculo se tomó en consideración, en cuanto los niveles de expresión relativa de los genes, los siguientes valores de corte: grupos de pacientes con TBLT: < 2.0 ; grupos de pacientes con TBPA: ≥ 2.0 (70).

V.13.10. Prueba de Mann-Whitney para el análisis estadístico de los datos de expresión. Se usó la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney para determinar si las medianas entre los dos subgrupos de pacientes TBLT y TBPA son estadísticamente diferentes en los genes analizados; la prueba se aplicó usando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (San Diego, Ca. USA). Para ello se efectuó un análisis de dos colas e intervalos de confianza del 95%, sin asumir que los valores de expresión relativa de los diferentes pacientes tuvieran valores con una distribución normal (Gaussiana). Al comparar la distribución de rangos y no de valores promedio, se minimizó la variación en los datos.

VI. RESULTADOS

VI.1. Genes de humano que presentaron homología con los genes asociados con el desarrollo de la tuberculosis pulmonar activa en un modelo experimental de ratón. De las 362 secuencias de oligonucleótidos analizadas, sólo 289 de éstas correspondieron a secuencias relacionadas a genes de ratón, los cuales, en el modelo experimental de infección tuberculosa estudiado están involucradas en el desarrollo de la enfermedad activa. De las 73 secuencias restantes, en 22 no se encontraron los genes ortólogos de humano, mientras que 51 de ellas corresponden a 24 secuencias duplicadas en el arreglo. Así, el 85% de los genes de ratón identificados tuvieron homología con secuencias de humano, mientras que el 15% del total no mostraron correspondencia.

Los números de acceso a GeneBank de los 289 genes de humano identificados, se almacenaron en un archivo de Excel para posteriormente realizar el diseño de los correspondientes oligonucleótidos que contendría el microarreglo CustomArray 4X2K de CombiMatrix. En esta base de datos se incluyeron además, los números de acceso de los demás grupos de genes considerados en el diseño de dicho microarreglo.

VI.2. Características del microarreglo de expresión CustomArray 4X2K “UIMZ-IMSS-MX”. El biochip electrónico CustomArray 4X2K de CombiMatrix diseñado para nuestros propósitos, contiene cuatro sectores en los cuales pueden llevarse a cabo la hibridación de cuatro diferentes muestras al mismo tiempo. Cada sector contiene 2,240 microelectrodos y, para nuestro diseño, cada sector del microarreglo contiene un grupo de 1,208 oligonucleótidos correspondientes a 446 genes de nuestro interés, los cuales incluyen genes problema y de control. La mayoría de los genes del arreglo están representados por 3 secuencias específicas y altamente conservadas, y muy pocos por 1 ó 2 de estas secuencias. Así, cada sector del CustomArray 4X2K contiene un total de 2,240 sondas con longitud de entre 35-40 mer.

De los genes problema de humano incluidos en el chip, 7 están relacionados con la actividad antimicrobiana de ciertas células humanas; 26 son genes candidatos involucrados en la patogénesis de DM2; 248 son homólogos a genes relacionados en el desarrollo a TBPA en el modelo de ratón mencionado, así como 106 genes involucrados en los mecanismos de la inflamación en el humano. De estos grupos de genes, se incluyeron 3 diferentes oligonucleótidos por gen con 1 ó 2 copias cada uno. Así, cada sector del microarreglo contiene en general entre 4-6 secuencias específicas para interrogar a cada uno de estos genes.

En la patogénesis de la tuberculosis se considera que existe una respuesta inflamatoria exacerbada y sin control por parte del huésped. Esto es más visible en la TBPA, por lo que en el diseño del microarreglo se

incluyó un grupo importante de genes relacionados con respuesta inflamatoria. Por otro lado, se incluyeron también genes que codifican para la síntesis de péptidos antimicrobianos, ya que se ha reportado que la expresión disminuida de este tipo de genes en el humano, está relacionada con fallas en la respuesta inmune innata ante la infección por microorganismos intracelulares; en este grupo de genes se incluyó uno relacionado con la producción del péptido catelicidina, el cual tiene un papel muy importante en la patogénesis de la TBPA humana. De igual forma, y debido a que no se conocen los genes asociados a un riesgo relativo alto para desarrollar TBPA en los pacientes con DM2, se incluyó una lista de genes candidatos que son condicionantes para el desarrollo de la DM2.

El diseño del microarreglo incluyó controles de hibridación tanto positivos como negativos. Como controles positivos y para normalizar resultados, se incluyeron 44 genes constitutivos de humano o “house keeping genes”. El microarreglo cuenta con una secuencia altamente conservada y específica de cada gene, con tres replicados distribuidos en el microarreglo. Se incluyeron genes constitutivos de alto, mediano y bajo nivel de expresión con el objeto de cubrir un intervalo amplio de señales de hibridación; con los triplicados de los genes constitutivos se tienen más de 100 sondas control, lo cual garantiza una buena normalización de los resultados. Es decir, permite normalizar los datos de expresión en genes constitutivos, para reducir las variaciones producidas por errores humanos o técnicos, durante la realización de los diferentes experimentos.

Por otro lado, se incluyeron por duplicado, las secuencias de 3 genes de *Arabidopsis thaliana* como controles positivos heterólogos de hibridación. Se incluyeron, además, secuencias heterólogas como controles negativos, con 2 replicados cada uno, pertenecientes a 3 genes del fago lambda, 3 de *Agrobacterium tumefaciens*, y 3 de *Arabidopsis thaliana*. La intensidad de las señales de hibridación de los 3 controles positivos complementarios a los “Spike controls” (mRNAs de 3 genes de *Arabidopsis thaliana*), se usó para evaluar la funcionalidad del ensayo de hibridación al microarreglo y para la validación del proceso de amplificación y marcaje de los transcritos de las muestras problema. Los controles negativos fueron incluidos con el propósito de evaluar el ruido de fondo durante la hibridación al microarreglo.

Para fines de operación, el microarreglo CustomArray 4X2K de CombiMatrix diseñado se denominó: “UIMZ-IMSS-MX” (figura 3).

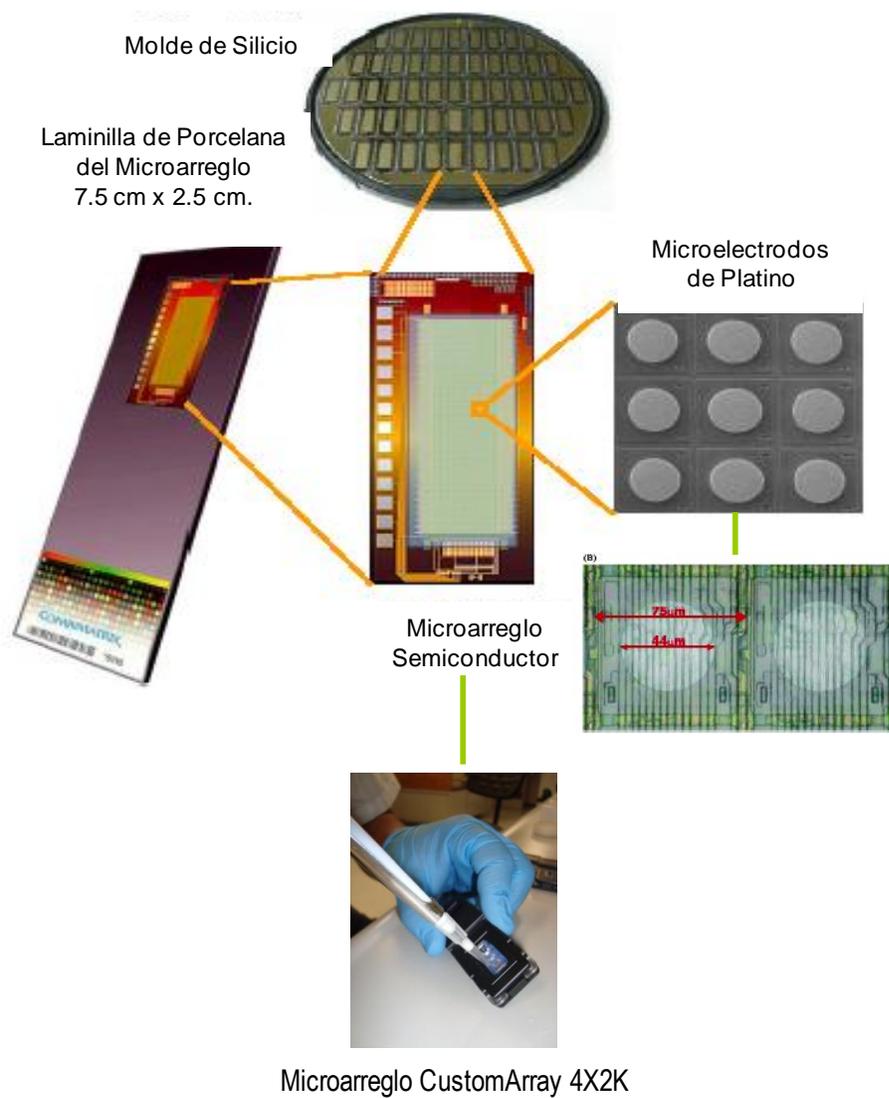


Figura 3. Características del microarreglo CustomArray 4X2K de CombiMatrix “UIMZ-IMSS-MX”.

VI.3. Reclutamiento de los individuos y obtención del material biológico. A lo largo de tres años, de enero del 2006 a diciembre del 2008, se reclutó el número total de individuos establecido previamente para el estudio, mismos que reunieron los criterios de selección preestablecidos: 60 individuos, 10 por cada uno de los seis subgrupos clínicos. En la tabla 5 se indican las características generales de estos individuos, tal como el número de registro, edad, sexo, fecha de la toma sanguínea, y el subgrupo clínico al que pertenecen. De los 60 individuos, 37 (61.6%) corresponden al sexo femenino y 23 (38.4 %) al sexo masculino. De los 10 pacientes del subgrupo DM2/TBPA, 7 de ellos (70%) corresponden al sexo femenino, y 3 (30%) al sexo masculino; mientras que de los 10 pacientes del subgrupo NO DM2/TBPA, 1 de ellos (10%) corresponde al sexo femenino, y los 9 restantes (90%) al sexo masculino.

En particular, la mayoría de individuos de los subgrupos DM2/TBLT y DM2/CONTROL se reclutaron a partir del proyecto de investigación señalado previamente, relacionado con el estudio de la prevalencia y los factores de riesgo asociados a TBLT en pacientes con DM2 en clínicas del IMSS de las ciudades de Zacatecas y Durango y sus zonas conurbadas. Los pacientes de los demás subgrupos clínicos se reclutaron del estudio de la epidemiología molecular de la tuberculosis en el Estado de Zacatecas; ambos proyectos realizados por nuestro grupo de investigación. Algunos pacientes con TBPA se reclutaron una vez que se les diagnosticó la enfermedad activa en algunas de las unidades hospitalarias de los Servicios de Salud y del IMSS en Zacatecas y Durango; algunos otros, a partir de su búsqueda intencionada en la población abierta mediante barridos epidemiológicos que involucraron la visita a más de 35 mil domicilios.

De cada uno de los individuos reclutados se cuenta con el respaldo documental respectivo, incluido en un expediente personalizado, que incluye los datos y resultados de los estudios realizados. Cada expediente contiene los siguientes documentos debidamente requisitados y firmados: a) Carta de consentimiento informado; b) Cuestionario clínico-epidemiológico; c) Cédula de aplicación del PPD; d) Cédula de aplicación de candidina (cuando el PPD sea ≤ 10 mm); e) Placa radiológica de tórax; f) Resultados de análisis clínicos básicos; g) Resultados de BAAR emitidos por un analista certificado por la SSA; h) Resultados de QuantiFeron-Gold; i) Resultados de la aplicación del PPD y candidina realizadas por personal certificado por la SSA; j) Interpretación de las radiografías de tórax realizada por médicos neumólogos, y k) Resultados del cultivo de *M. tuberculosis* o de la PCR IS6110 realizados a partir de muestras de expectoración. A todos los individuos se les tomó muestras de sangre periférica directamente en tubos PAXgene para su conservación y posterior utilización.

TABLA 5. Características generales de los individuos que integran el estudio.

CLAVE	REGISTRO	SUBGRUPO CLÍNICO*	EDAD	SEXO	FECHA TOMA SANGUÍNEA
01-NO DM2/CONTROL	50-BEN (MA-22)	VI	22	F	21/02/07
02-NO DM2/CONTROL	144-BEN (MA-76)	VI	42	M	21/06/07
03-NO DM2/CONTROL	91-BEN (MA-45)	VI	20	F	23/01/07
04-NO DM2/CONTROL	92-BEN (MA-46)	VI	30	F	23/01/07
05-NO DM2/CONTROL	93-BEN (MA-47)	VI	42	F	24/01/07
06-NO DM2/CONTROL	94-BEN (MA-48)	VI	52	F	24/01/07
07-NO DM2/CONTROL	95-BEN (MA-50)	VI	51	F	25/01/07
08-NO DM2/CONTROL	139-BEN (MA-71)	VI	22	M	25/06/07
09-NO DM2/CONTROL	140-BEN (MA-72)	VI	20	M	25/06/07
10-NO DM2/CONTROL	149-BEN (MA-80)	VI	24	M	26/06/07
11-NO DM2/TBLT	102-BEN (56-MA)	II	36	F	31/01/07
12-NO DM2/TBLT	103-BEN (57-MA)	II	54	F	31/01/07
13-NO DM2/TBLT	104-BEN (58-MA)	II	37	F	31/01/07
14-NO DM2/TBLT	151-BEN (MA-82)	II	20	M	02/07/07
15-NO DM2/TBLT	01-BEN (MA-04)	II	24	F	30/03/06
16-NO DM2/TBLT	05-BEN (MA-01)	II	21	F	30/03/06
17-NO DM2/TBLT	36-BEN (MA-14)	II	61	F	12/07/06
18-NO DM2/TBLT	72-BEN (MA-31)	II	44	F	11/01/07
19-NO DM2/TBLT	90-BEN (MA-44)	II	41	F	22/01/06
20-NO DM2/TBLT	82-BEN (MA-36)	II	45	F	16/01/06
21-NO DM2/TBPA	98-BEN (D-084)	IV	55	M	15/01/07
22-NO DM2/TBPA	132-BEN (000-123-000)	IV	24	F	29/05/07
23-NO DM2/TBPA	156-BEN (D-147)	IV	42	M	09/08/07
24-NO DM2/TBPA	157-BEN (D-199)	IV	61	M	20/09/07
25-NO DM2/TBPA	162-BEN (00062)	IV	52	M	23/11/07
26-NO DM2/TBPA	171-BEN (000-337-000)	IV	29	M	24/04/08
27-NO DM2/TBPA	174-BEN (000-262-021)	IV	62	M	06/05/08
28-NO DM2/TBPA	179-BEN (000-346-000)	IV	56	M	14/07/08
29-NO DM2/TBPA	180-BEN (000-040-000)	IV	28	M	15/07/08
30-NO DM2/TBPA	181-BEN (000-348-000)	IV	33	M	15/07/08

F: Femenino; M: Masculino; DM2: Diabetes mellitus tipo 2; NO DM2: sin DM2; TBLT: tuberculosis latente; TBPA: tuberculosis pulmonar activa. * De acuerdo a la clasificación de los subgrupos anotados en la figura 2.

TABLA 5. Continuación.

CLAVE	REGISTRO	SUBGRUPO CLÍNICO*	EDAD	SEXO	FECHA TOMA SANGUÍNEA
31-DM2/CONTROL	117-BEN (D-025)	V	42	F	14/03/07
32-DM2/CONTROL	119-BEN (D-048)	V	56	F	14/03/07
33-DM2/CONTROL	67-BEN (5785)	V	65	M	10/01/07
34-DM2/CONTROL	68-BEN (5181)	V	59	F	10/01/07
35-DM2/CONTROL	69-BEN (5206)	V	56	F	10/01/07
36-DM2/CONTROL	78-BEN (3114)	V	63	M	15/01/07
37-DM2/CONTROL	79-BEN (1088)	V	52	F	15/01/07
38-DM2/CONTROL	80-BEN (2049)	V	51	M	15/01/07
39-DM2/CONTROL	81-BEN (4960)	V	58	F	15/01/07
40-DM2/CONTROL	51-BEN (MA-27)	V	48	M	31/07/06
41-DM2/TBLT	24-BEN (0693)	I	50	F	24/05/06
42-DM2/TBLT	15-BEN (4073)	I	50	F	02/05/06
43-DM2/TBLT	13-BEN (4941)	I	49	F	25/04/06
44-DM2/TBLT	21-BEN (5075)	I	64	M	22/05/06
45-DM2/TBLT	11-BEN (5577)	I	53	F	18/04/06
46-DM2/TBLT	14-BEN (5606)	I	60	F	25/04/06
47-DM2/TBLT	110-BEN (D-001)	I	47	F	14/03/07
48-DM2/TBLT	112-BEN (D-004)	I	54	M	14/03/07
49-DM2/TBLT	114-BEN (D-009)	I	55	F	14/03/07
50-DM2/TBLT	118-BEN (D-028)	I	47	F	14/03/07
51-DM2/TBPA	65-BEN (00100)	III	57	M	27/09/06
52-DM2/TBPA	84-BEN (MA-38)	III	54	F	17/01/06
53-DM2/TBPA	109-BEN (000-57-000)	III	63	F	26/02/07
54-DM2/TBPA	160-BEN (D-247)	III	47	F	24/10/07
55-DM2/TBPA	161-BEN (000-220-000)	III	62	F	5/11/07
56-DM2/TBPA	163-BEN (000-227-000)	III	60	F	26/11/07
57-DM2/TBPA	165-BEN (000-232-000)	III	64	F	18/01/08
58-DM2/TBPA	166-BEN (000-239-000)	III	64	F	03/01/08
59-DM2/TBPA	167-BEN (000-308-000)	III	63	M	08/02/08
60-DM2/TBPA	173-BEN (000-340-000)	III	47	M	28/05/08

F: Femenino; M: Masculino; DM2: con Diabetes mellitus tipo 2; NO DM2: sin DM2; TBLT: tuberculosis latente; TBPA: tuberculosis pulmonar activa. * De acuerdo a la clasificación de los subgrupos anotados en la figura 2.

Los primeros seis individuos de cada uno de los 6 subgrupos clínicos conformaron el grupo de entrenamiento (training set) que se incluyeron en el estudio de microarreglos; los 4 individuos restantes integraron el grupo de prueba (test set). Los 10 individuos que conforman cada subgrupo clínico se analizaron por RT-PCR en tiempo real, para medir los niveles de expresión relativa de los genes diferencialmente expresados en los pacientes con TBPA, en relación a los individuos con TBLT, que se identificaron por microarreglos, con el fin de su validación.

VI.4. RNA total. El RNA total extraído de las primeras muestras sanguíneas analizadas se sometió a electroforesis como se describió previamente. En los geles se observaron tres bandas con una talla molecular de aproximadamente 9.0 kpb, 5.0 kpb y 2.0 kpb. Se concluyó que la primera de ellas correspondía a DNA genómico contaminante, ya que ésta desapareció una vez que la muestra de RNA total se sometió a una digestión en columna utilizando la enzima DNasa I libre de RNasas. De aquí que durante el procedimiento de extracción del RNA de todas las muestras sanguíneas subsecuentes, se realizara una digestión con la enzima DNasa I (Datos no mostrados). Las otras dos bandas observadas correspondían, según sus tallas moleculares relativas, a las subunidades 28S y 18S del rRNA. La identificación de dichas bandas fue posible cuando se compararon las tallas moleculares de muestras problemas de RNA total con las bandas que corresponden a las subunidades 28S y 18S de una muestra de rRNA control proveniente de células HeLa de humano, las cuales corresponden a las subunidades 28S y 18S. Las tallas moleculares de estas subunidades fue confirmado al evaluar su movilidad relativa comparadas con un marcador de talla molecular de RNA (bandas de 0.24 a 9.5 kb), correspondiendo a 5.0 kb y 1.9 kb respectivamente.

Por otro lado, la integridad de las bandas de 28S y 18S del rRNA de las muestras problema fue analizada por densitometría (Syngene, UK), encontrando que los valores espectrofotométricos del cociente 28S/18S corresponden al valor esperado de 2.0. Esto es importante, ya que se garantiza que los diferentes moléculas de mRNAs también presenten buena integridad, lo cual es fundamental para realizar los estudios de expresión por microarreglos y RT-PCR en tiempo real.

En relación al rendimiento obtenido del RNA total, éste varió significativamente entre diferentes muestras. Así por ejemplo, la cantidad de RNA total extraído a partir del mismo volumen de sangre periférica de tres donadores sanos fue de 10.4 μg , 6.9 μg , y 2.3 μg respectivamente. Esto podría deberse a variaciones en el número de leucocitos presentes (9,700/ μl , 8,600/ μl , y 4,100/ μl respectivamente), ya que se observó una aparente correlación entre el número de leucocitos/ μl de sangre y el rendimiento de RNA obtenido. Considerando que algunos individuos pudieran contener bajo número de leucocitos y con base en estos resultados, se tomaron 3 tubos PAXgene por paciente (aproximadamente 7.5 ml de sangre). Nuestros cálculos indicaron que con este volumen de sangre se aseguraría la obtención de cantidad suficiente de RNA total por individuo (mínimo 3 μg) necesaria para realizar los subsecuentes procedimientos, aún cuando estos llegasen a presentar un bajo número de leucocitos.

VI.5. Análisis electroforético del RNA total extraído a partir de muestras de sangre total de individuos de diferentes subgrupos clínicos. En la figura 4 se muestra pueden observar diferentes muestras de RNA total obtenido a partir de 7 muestras de sangre periférica del mismo número de individuos

(31-DM2/CONTROL, 32-DM2/CONTROL, 34-DM2/CONTROL, 35-DM2/CONTROL, 37-DM2/CONTROL, 11-NO DM2/TBLT y 12-NO DM2/TBLT respectivamente) pertenecientes a dos subgrupos clínicos representativos del estudio. Se observa que todas las muestras de RNA total extraídas presentan una buena integridad, según se puede apreciar por la intensidad de las subunidades 28S y 18S del rRNA. En cada carril se depositaron 400 ng de RNA total de cada una de las muestras.

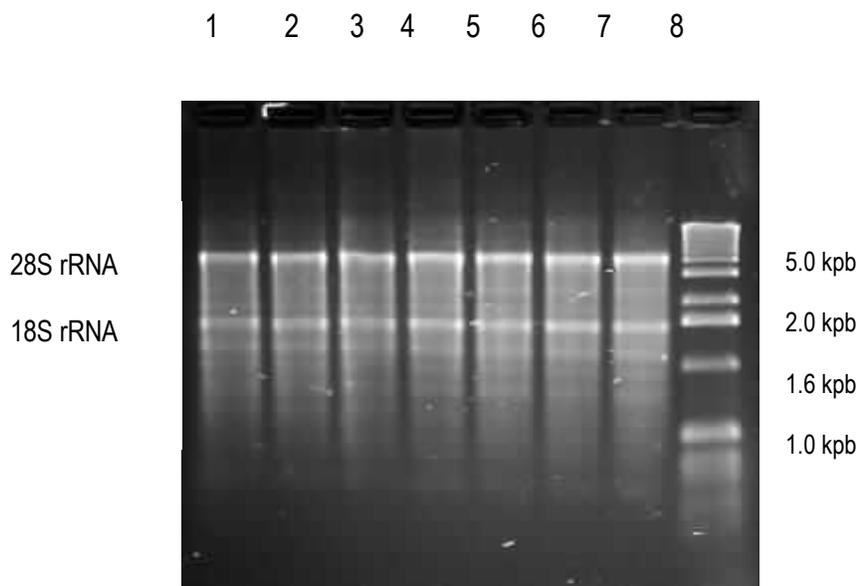


Figura 4. Electroferograma de RNA total extraído a partir de muestras de sangre completa de 7 individuos de diferentes subgrupos clínicos. Carriles 1-7: 400 ng de diferentes muestras de RNA total; carril 8: marcador de talla molecular (DNA 0.5-10 kpb). Gel de agarosa nativo al 1.2% TBE 1X; 150 V /10 min, 110 V /20 min. Tinción con solución de bromuro de etidio (0.05%).

En el procedimiento de extracción del RNA total mediante el sistema PAXgene se identificaron varios factores que influyen en su rendimiento, los cuales se consideraron al procesar las muestras sanguíneas de los individuos que integraron el estudio:

- 1) Número de leucocitos/ μ l de sangre de cada paciente: aparentemente, en algunos individuos no está relacionado en forma proporcional el rendimiento de RNA total con respecto al número de leucocitos.

- 2) Estado de conservación de la muestra sanguínea: aparentemente, y en concordancia con reportes técnicos del Sistema PAXgene, se puede incrementar el rendimiento de RNA congelando las muestras sanguíneas a - 80°C durante algunos días, previo a la extracción del RNA.
- 3) El volumen de sangre depositado en los tubos PAXgene determina el rendimiento de RNA, el cual es directamente proporcional al volumen de sangre contenida en los tubos PAXgene.
- 4) Aspectos técnicos durante el proceso de extracción (pipeteo vs decantación, en el paso de lavado de la sangre): se observó que al decantar se pierde por arrastre una parte importante del botón de leucocitos, afectando considerablemente el rendimiento final del RNA; optándose realizar el lavado mediante pipeteo.
- 5) Mejoras en la versión actualizada del “kit” de extracción de RNA PAXgene: El uso de las columnas de disgregación incluidas en la versión reciente del “kit”, incrementa el rendimiento de RNA al eliminar el detritus celular que resulta del rompimiento de las células blancas, permitiendo que el RNA tenga más superficie de unión a la membrana de las columnas de extracción.

VI.6. Concentración y enriquecimiento de muestras de RNA total. Durante el proceso de concentración del RNA total su rendimiento disminuyó en un promedio de 28% respecto a la cantidad utilizada; esta disminución se debe a la eliminación de la mayoría de las moléculas de RNA menores de 200 nucleótidos (tales como el 5.8S rRNA, el 5S rRNA y el tRNA, los cuales juntos comprenden el 15-20 % del RNA total). Tanto la integridad como la pureza del RNA concentrado y enriquecido fueron de calidad similar a la obtenida en las muestras de RNA total.

VI.7. Eliminación de transcritos de globina. Se observó que durante el proceso de eliminación de transcritos de globina en las diferentes muestras de RNA concentradas el rendimiento del RNA se disminuyó en promedio un 40%.

Para determinar la integridad de las muestras de RNA libre de transcritos de globina obtenidas con el mediante el procedimiento “GOBINclear-Human” y con esto asegurar la calidad del RNA que sería utilizado en los ensayos de hibridación a microarreglos, se realizaron varias electroforesis en geles nativos de agarosa al 1.2% en TBE 1X; 150 V /10 min, 110 V /20 min y teñidos con una solución de bromuro de etidio al 0.05%. Se concluyó que la integridad de las muestras de RNA libre de transcritos de globina obtenidas fue la adecuada para realizar posteriormente los ensayos de amplificación y marcaje de los diferentes muestras de RNA, ya que las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del rRNA conservaron una relación aproximada de 2:1, tal y como se obtuvieron en las muestras del RNA total y del RNA concentrado. En el presente escrito se nombra al RNA libre de transcritos de globina también como “RNA GLOBINclear”.

En la figura 5 se pueden observar diferentes muestras de RNA libre de transcritos de globina provenientes de 7 diferentes individuos problema (45-DM2/TBLT, 46-DM2/TBLT, 03-NO DM2/CONTROL, 38-DM2/CONTROL, 44-DM2/TBLT, 31-DM2/CONTROL y 12-NO DM2/TBLT respectivamente), correspondientes a cuatro subgrupos clínicos distintos representativos del estudio. Se puede apreciar que todas las muestras presentan una buena integridad, ya que la relación que guardan las dos bandas de las subunidades 28S y 18S del rRNA es de aproximadamente 2:1.

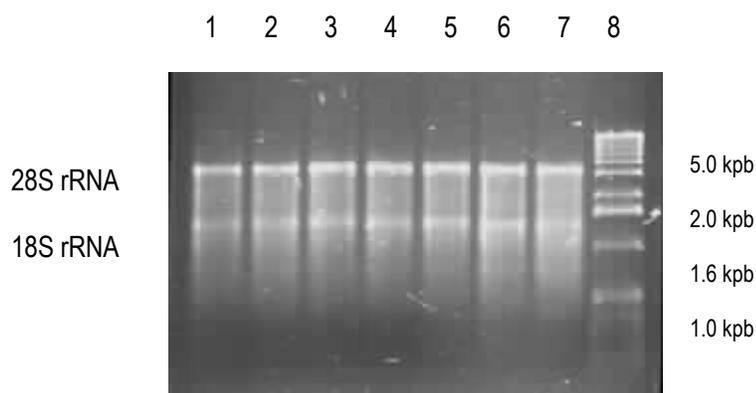


Figura 5. Electroferograma del RNA libre de transcritos de globina. Carriles 1-7: 200 ng de diferentes muestras de RNA GLOBINclear; carril 8: marcador de talla molecular (DNA 0.5-10 kpb). Gel de agarosa nativo al 1.2% TBE 1X; 150 V /10 min, 110 V /20 min. Tinción con solución de bromuro de etidio (0.05%).

VI.8. Amplificación y marcaje del RNA. En los experimentos iniciales de amplificación y marcaje se obtuvo un rendimiento promedio de 14.5 μ g de cRNA-biotina a partir de muestras de 200 ng de RNA libre de transcritos de globina provenientes de diferentes individuos; en el caso de la muestra RNA control de células HeLa se obtuvo un rendimiento de 20.3 μ g de cRNA-biotina utilizando la misma cantidad de RNA. Se considera que la amplificación es exitosa cuando se producen alrededor de 16 μ g de cRNA-biotina a partir de 200 ng de RNA control. La cantidad de que se obtiene de cRNA-biotina es más que suficiente para realizar los experimentos de hibridación de cada individuo, ya que para hibridar un sector del 4X2K CustomArray se utiliza solamente 1.0 μ g de cRNA-biotina, por lo que es posible realizar varios experimentos de hibridación al microchip.

Por lo anterior, para llevar a cabo la síntesis de cRNA-biotina solamente se utilizaron 100 ng de RNA libre de transcritos de globina en los 36 individuos que conformaron el estudio de microarreglos (training set), ya que en algunos de los pacientes con TBPA la cantidad de RNA libre de transcritos de globina obtenida fue menor que el promedio general. Con esta cantidad inicial de 100 ng de RNA se obtuvo cantidad suficiente de cRNA-biotina en cada individuo para realizar los experimentos de hibridación al microarreglo.

VI.9. Condiciones experimentales generales para realizar los estudios de microarreglos de expresión, establecidas con base en los procedimientos estandarizados.

Para todos los procedimientos de hibridación se llevó a cabo un análisis de las cantidades mínimas de RNA y los volúmenes máximos permisibles para tener un resultado de hibridación eficiente y reproducible (figura 6). En este sentido, para realizar la hibridación en cada uno de los sectores del microarreglo CustomArray 4X2K se requiere de 1.0 μg de cRNA-biotina, de tal forma que son necesarios un de total 2.0 μg para hibridar 2 sectores del microarreglo por individuo, lo que representa experimentos por cuadruplicado.

Se determinó que al concentrar el RNA total mediante columnas y al realizar el procedimiento de eliminación de transcritos de globina el rendimiento inicial disminuye. Así, en el primero puede disminuir en un 25% en promedio y en el segundo hasta en un 40%. Es por ello que consideramos importante calcular la cantidad mínima de RNA total inicial, así como el RNA requerido en los pasos subsiguientes.

De tal forma que la cantidad mínima de RNA total que se necesita por cada individuo a investigar es de 3.0 μg . Para el procedimiento de eliminación de transcritos de globina por cada individuo se requiere de 2.0 μg de RNA concentrado y enriquecido en un volumen máximo de 14 μl . Mientras que para la amplificación y marcaje del RNA son necesarios 100 ng de RNA libre de transcritos de globina en un volumen máximo de 14 μl , con lo cuales se producen entre alrededor de 12.0 μg de cRNA-biotina. Como ya se mencionó, por cada individuo se requiere la hibridación de dos de los cuatro sectores del microarreglo 4X2K CustomArray, por lo que se necesita un total de 2 μg de cRNA-biotina (1.0 μg /sector).

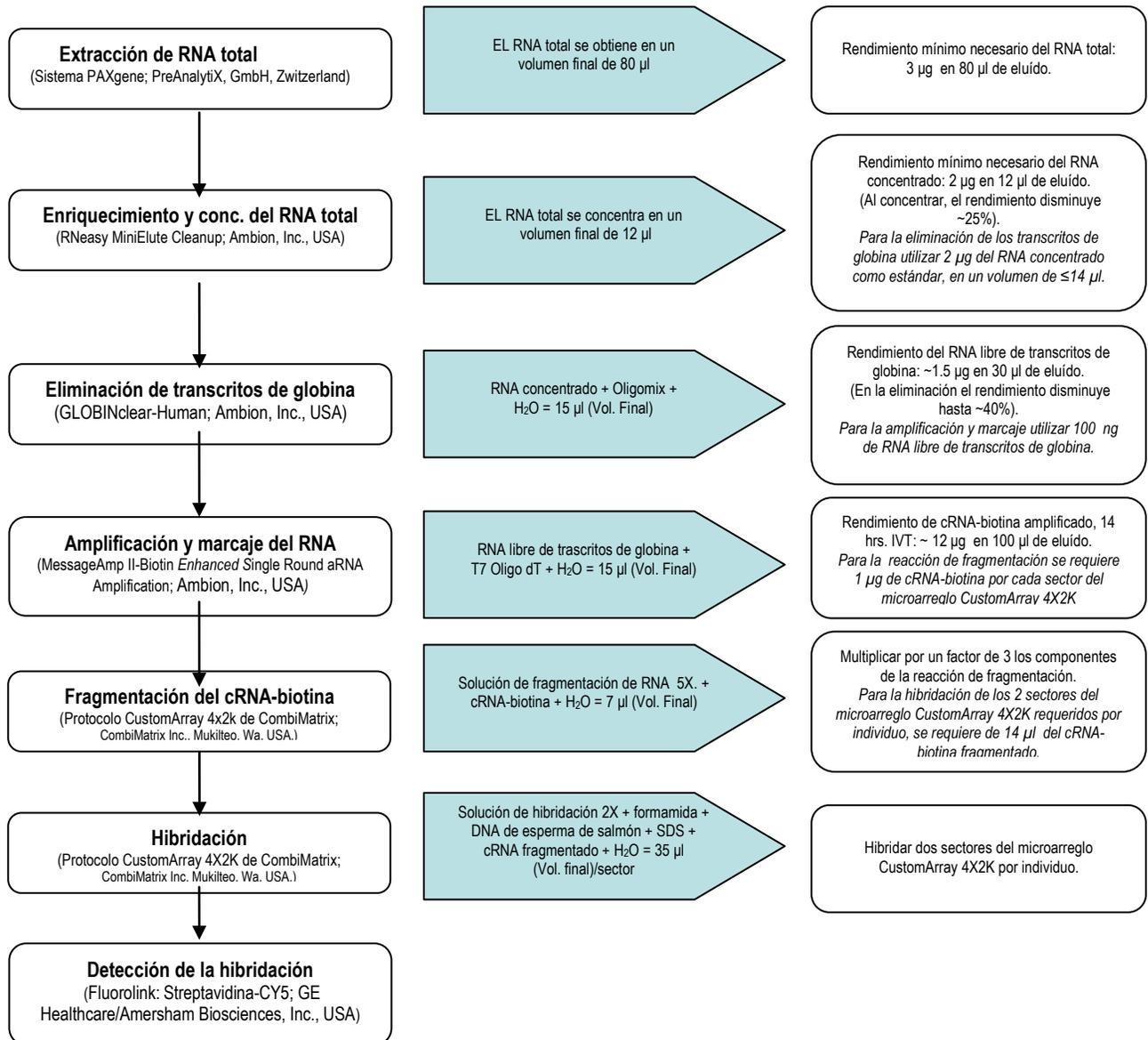


Figura 6. Condiciones experimentales generales para realizar los estudios de microarreglos de expresión, establecidas con base en los procedimientos estandarizados.

En la tabla 5 se indica el rendimiento de los tipos de RNA obtenidos en los diferentes procesos realizados (aislamiento de RNA total, concentración y enriquecimiento, eliminación de transcritos de globina, amplificación y marcaje con biotina) provenientes de las muestras sanguíneas de los 60 individuos que conforman los seis subgrupos clínicos del estudio. La síntesis de cRNA-biotina sólo se hizo para las 36

muestras destinadas al estudio de microarreglos, las cuales correspondieron al grupo de ensayo o “training set”, mientras que las 60 muestras de RNA libre de transcritos de globina obtenidas se utilizaron para realizar los ensayos de RT-PCR en tiempo real en el grupo de prueba o “test set”. El rendimiento del RNA total, del RNA concentrado y enriquecido, del RNA GLOBINclear y del cRNA-biotina, se calculó considerando un volumen final de elusión en cada procedimiento de 80 μ l, 12 μ l, 30 μ l y 100 μ l respectivamente. Por otro lado, todas las muestras de cRNA-biotina sintetizadas presentaron una alta pureza ya que el valor de la relación de la absorbancia a 260/280 nm fue aproximadamente 2.0 en casi todos los casos.

Tabla 6. Rendimiento del RNA total, del RNA concentrado y enriquecido, del RNA libre de transcritos de globina y del cRNA-biotina, de los 60 individuos pertenecientes a los 6 subgrupos clínicos.

Clave	Registro	Rendimiento (µg)*			
		RNA total	RNA conc. y enriq.	RNA "GLOBINclear"	cRNA-biotina**
01-NO DM2/CONTROL	50-BEN (MA-22)	3.4	2.5	1.39	8.9
02-NO DM2/CONTROL	144-BEN (MA-76)	3.2	1.8	1.11	22.1
03-NO DM2/CONTROL	91-BEN (MA-45)	4.9	1.9	1.52	24.2
04-NO DM2/CONTROL	92-BEN (MA-46)	6.9	3.0	1.24	20.8
05-NO DM2/CONTROL	93-BEN (MA-47)	6.1	4.7	1.73	8.8
06-NO DM2/CONTROL	94-BEN (MA-48)	4.6	2.7	1.64	9.0
07-NO DM2/CONTROL	95-BEN (MA-50)	3.5	2.5	1.69	N/A
08-NO DM2/CONTROL	139-BEN (MA-71)	7.6	3.0	1.40	N/A
09-NO DM2/CONTROL	140-BEN (MA-72)	7.5	2.1	1.20	N/A
10-NO DM2/CONTROL	149-BEN (MA-80)	6.2	2.8	1.40	N/A
11-NO DM2/TBLT	102-BEN (56-MA)	6.1	3.5	1.43	15.6
12-NO DM2/TBLT	103-BEN (57-MA)	6.9	3.8	1.74	7.9
13-NO DM2/TBLT	104-BEN (58-MA)	4.0	2.5	1.40	15.4
14-NO DM2/TBLT	151-BEN (MA-82)	6.6	3.0	1.2	14.6
15-NO DM2/TBLT	01-BEN (MA-04)	9.9	2.4	0.90	8.2
16-NO DM2/TBLT	05-BEN (MA-01)	7.0	3.9	2.10	8.6
17-NO DM2/TBLT	36-BEN (MA-14)	8.4	6.0	1.92	N/A
18-NO DM2/TBLT	72-BEN (MA-31)	6.1	3.5	1.45	N/A
19-NO DM2/TBLT	90-BEN (MA-44)	5.9	3.4	1.65	N/A
20-NO DM2/TBLT	82-BEN (MA-36)	7.7	2.2	1.44	N/A
21-NO DM2/TBPA	98-BEN (D-084)	2.1	1.2	1.60	12.0
22-NO DM2/TBPA	132-BEN (000-123-000)	8.0	5.1	2.10	11.0
23-NO DM2/TBPA	156-BEN (D-147)	12.8	7.5	1.80	11.2
24-NO DM2/TBPA	157-BEN (D-199)	10.7	6.8	1.90	10.4
25-NO DM2/TBPA	162-BEN (00062)	7.4	6.1	2.00	11.7
26-NO DM2/TBPA	171-BEN (000-337-000)	20	7.6	0.80	8.6
27-NO DM2/TBPA	174-BEN (000-262-021)	3.9	1.9	0.72	N/A
28-NO DM2/TBPA	179-BEN (000-346-000)	6.1	1.6	1.1	N/A
29-NO DM2/TBPA	180-BEN (000-040-000)	2.2	0.7	0.41	N/A
30-NO DM2/TBPA	181-BEN (000-348-000)	14.4	5.6	1.23	N/A

* El rendimiento del RNA total, del RNA concentrado y enriquecido, del RNA libre de transcritos de globina (GLOBINclear) y del aRNA-biotina, se calculó considerando un volumen final de 80 µl, 12 µl, 30 µl y 100 µl respectivamente. ** La síntesis del cRNA-biotina se hizo solamente para los individuos del grupo de entrenamiento o "training set" para los ensayos de microarreglos. N/A: no aplica (los pacientes corresponden al grupo de prueba o "test set" para los ensayos de RT-PCR en tiempo real).

Tabla 6. Continuación.

Clave	Registro	Rendimiento (µg)*			
		RNA total	RNA conc y enriq.	RNA "GLOBINclear"	cRNA-biotina**
31-DM2/CONTROL	117-BEN (D-025)	9.6	4.8	1.93	16.2
32-DM2/CONTROL	119-BEN (D-048)	4.7	3.1	1.46	14.0
33-DM2/CONTROL	67-BEN (5785)	3.4	2.6	2.10	10.1
34-DM2/CONTROL	68-BEN (5181)	13.0	7.3	1.64	6.4
35-DM2/CONTROL	69-BEN (5206)	8.2	4.1	1.56	15.3
36-DM2/CONTROL	78-BEN (3114)	3.5	2.4	1.67	10.3
37-DM2/CONTROL	79-BEN (1088)	7.3	4.1	1.71	N/A
38-DM2/CONTROL	80-BEN (2049)	5.4	3.8	1.57	N/A
39-DM2/CONTROL	81-BEN (4960)	5.0	3.3	1.54	N/A
40-DM2/CONTROL	51-BEN (MA-27)	18.5	14	1.86	N/A
41-DM2/TBLT	24-BEN (0693)	4.5	2.8	1.74	4.9
42-DM2/TBLT	15-BEN (4073)	3.3	1.7	1.07	6.7
43-DM2/TBLT	13-BEN (4941)	3.4	2.4	1.62	7.5
44-DM2/TBLT	21-BEN (5075)	3.4	2.4	1.74	4.5
45-DM2/TBLT	11-BEN (5577)	5.5	3.3	1.96	16.8
46-DM2/TBLT	14-BEN (5606)	5.8	3.0	1.85	6.0
47-DM2/TBLT	110-BEN (D-001)	20.2	12.8	1.38	N/A
48-DM2/TBLT	112-BEN (D-004)	4.1	2.6	1.42	N/A
49-DM2/TBLT	114-BEN (D-009)	8.5	5.9	1.72	N/A
50-DM2/TBLT	118-BEN (D-028)	10.7	7.0	1.77	N/A
51-DM2/TBPA	65-BEN (00100)	5.4	1.6	1.60	17.9
52-DM2/TBPA	84-BEN (MA-38)	10.7	5.2	1.52	13.1
53-DM2/TBPA	109-BEN (000-57-000)	1.8	1.1	0.90	12.9
54-DM2/TBPA	160-BEN (D-247)	9.5	6.4	2.10	13.3
55-DM2/TBPA	161-BEN (000-220-000)	5.8	2.7	1.70	13.2
56-DM2/TBPA	163-BEN (000-227-000)	4.2	4.2	0.90	11.9
57-DM2/TBPA	165-BEN (000-232-000)	5.9	4.2	1.70	N/A
58-DM2/TBPA	166-BEN (000-239-000)	5.7	1.3	0.88	N/A
59-DM2/TBPA	167-BEN (000-308-000)	6.4	2.6	1.58	N/A
60-DM2/TBPA	173-BEN (000-340-000)	16.6	10.9	1.2	N/A

* El rendimiento del RNA total, del RNA concentrado y enriquecido, del RNA libre de transcritos de globina (GLOBINclear) y del aRNA-biotina, se calculó considerando un volumen final de 80 µl, 12 µl, 30 µl y 100 µl respectivamente. ** La síntesis del cRNA-biotina se hizo solamente para los individuos del grupo de entrenamiento o "training set" para los ensayos de microarreglos. N/A: no aplica (los pacientes corresponden al grupo de prueba o "test set" para los ensayos de RT-PCR en tiempo real).

VI.10. Fragmentación del cRNA-biotina. Con el propósito de conocer la eficiencia en la reacción de fragmentación, 7 muestras de cRNA-biotina provenientes de individuos pertenecientes a los 6 subgrupos clínicos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa nativo, incluyendo una muestra de cRNA-biotina sintetizada a partir de RNA control (células HeLa). En el mismo gel se incluyeron muestras de cRNA-biotina de los mismos individuos no sometidas a la reacción de fragmentación.

La reacción de fragmentación de las muestras de cRNA-biotina se realizó en forma eficiente, ya que se obtuvieron fragmentos de alrededor de 50-200 pb, tal y como lo señala el “Protocolo para la Hibridación y Detección de Imágenes de los Microarreglos CustomArray 4X2K” de CombiMatrix. Se observó que la mancha de fragmentación se encuentra concentrada abajo de los 100 pb, es decir con fragmentos de entre 50-200 pb (figura 6). Esto garantiza una eficiente hibridación del cRNA biotinilado a sus respectivas secuencias complementarias en el microarreglo.

En las muestras de cRNA-biotina no sometidas a la reacción de fragmentación, se observó un barrido de fragmentos a lo largo del carril con tamaños de entre 100 y de más de 2000 bp, los cuales indican los diferentes tamaños de los transcritos o mRNAs amplificados contenidos en las muestras de RNA.

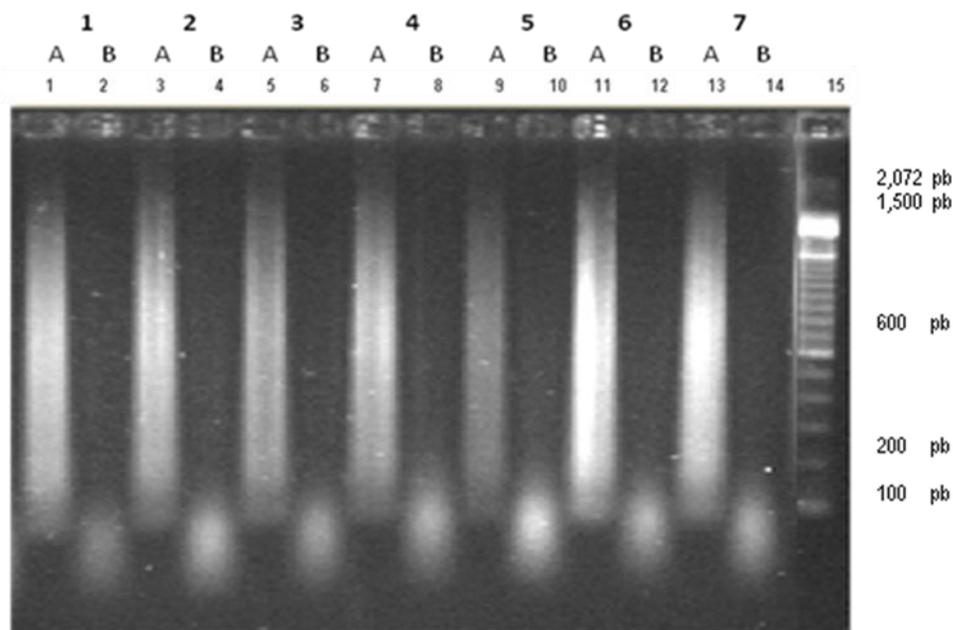


Figura 7. Electroferograma de muestras de cRNA-biotina no fragmentadas y fragmentadas provenientes de 6 individuos representativos de los 6 subgrupos clínicos. Carriles 1-12: muestras de cRNA-biotina de seis individuos; carriles 13 y 14: muestras de cRNA-biotina proveniente de RNA control (HeLa). Muestra no fragmentada (A) y muestra fragmentada (B): se usaron 2 μ l y 4 μ l respectivamente. Carril 15: escalera de DNA de 100 pb. Se utilizó un gel de agarosa nativo al 2% con amortiguador TBE1X. La electroforesis fue realizada a 100 V/45 min; el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.05%. La imagen se procesó en un lector GeneGenius (Synoptics, UK).

VI.11. Hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k de CombiMatrix. Al hibridar varios microarreglos con diferentes cantidades de los 3 controles de salpicado de *A. thaliana* (Spike controls), se determinó que la dilución que contiene 0.022 pg (dilución 1:18,518) brindó la mejor señal de hibridación sin producir saturación de dicha señal. Esta cantidad (0.022 pg) se utilizó en cada una de las muestras de RNA libre de transcritos de globina provenientes de los diferentes individuos del estudio, siguiendo el protocolo de amplificación y marcaje con biotina sugerido por el fabricante de los microarreglos CustomArray 4x2k.

Las señales de hibridación de los controles de salpicado funcionan como control positivo heterólogos y nos muestran además que los ensayos de hibridación a los microarreglos funcionaron adecuadamente, ya

que al agregar una concentración conocida y constante de controles de salpicado, nos permitió normalizar los valores de expresión de la hibridación para todas las secuencias del microarreglo.

VI.12. Lectura de los microarreglos. Previa a la lectura de los microarreglos, se realizaron ajustes al lector utilizando los valores de los controles de salpicado como referencia. Así, se determinó que el valor de PMT (ganancia de la señal que detecta el tubo fotomultiplicador del GenePix 4100A) óptimo para la lectura de las señales de fluorescencia asociada a la hibridación de los microarreglos correspondió a 500.

Con estos ajustes a las lecturas, y con la determinación adecuada de controles de salpicado, se llevó a cabo la hibridación de 36 muestras de RNA amplificadas y marcadas con biotina correspondientes a 36 individuos distintos (6 por subgrupos clínico); a este grupo de individuos fue considerado como el grupo de entrenamiento o “training set”. Cabe mencionar que las muestras se procesaron por duplicado por cada individuo (en dos sectores distintos, dos experimentos diferentes) y que internamente en cada sector, existían 2 a 3 replicados por cada secuencia.

En la tabla 7 se indican las muestras de cRNA-biotina de los 36 individuos que se hibridaron a los microarreglos CustomArray 4x2k correspondientes a los 6 subgrupos clínicos; se señala también, el número del chip, así como el sector del mismo al cual se hibridó cada muestra. En total se utilizaron 18 chips.

Tabla 7. Muestras de aRNA-biotina hibridadas a los microarreglos CustomArray 4x2k.

No.	Clave del paciente	Microarreglo	
		Número	Sector
1	01-NO DM2/CONTROL	10	1 y 2
2	05-NO DM2/CONTROL	10	3 y 4
3	06-NO DM2/CONTROL	16	1 y 2
4	07-NO DM2/CONTROL	16	3 y 4
5	08-NO DM2/CONTROL	17	1 y 2
6	09-NO DM2/CONTROL	17	3 y 4
7	16-NO DM2/TBLT	04	1 y 2
8	15-NO DM2/TBLT	04	3 y 4
9	17-NO DM2/TBLT	05	1 y 2
10	18-NO DM2/TBLT	05	3 y 4
11	20-NO DM2/TBLT	06	1 y 2
12	12-NO DM2/TBLT	06	3 y 4
13	23- NO DM2/TBPA	14	1 y 2
14	24- NO DM2/TBPA	14	3 y 4
15	25- NO DM2/TBPA	15	1 y 2
16	26- NO DM2/TBPA	15	3 y 4
17	21- NO DM2/TBPA	18	1 y 2
18	22- NO DM2/TBPA	18	3 y 4
19	40- DM2/CONTROL	07	1 y 2
20	33-DM2/CONTROL	07	3 y 4
21	39-DM2/CONTROL	08	1 y 2
22	36-DM2/CONTROL	08	3 y 4
23	38-DM2/CONTROL	09	1 y 2
24	34-DM2/CONTROL	09	3 y 4
25	45-DM2/TBLT	01	1 y 2
26	43-DM2/TBLT	01	3 y 4
27	46-DM2/TBLT	02	1 y 2
28	42-DM2/TBLT	02	3 y 4
29	44-DM2/TBLT	03	1 y 2
30	41-DM2/TBLT	03	3 y 4
31	51- DM2/TBPA	11	1 y 2
32	52- DM2/TBPA	11	3 y 4
33	53- DM2/TBPA	12	1 y 2
34	54- DM2/TBPA	12	3 y 4
35	55- DM2/TBPA	13	1 y 2
36	56- DM2/TBPA	13	3 y 4

En la tabla 8 se indica el número del experimento de hibridación al microarreglo que corresponde a cada uno de los 6 pacientes que integran los subgrupos NO DM2/TBLT y NO DM2/TPBA indicados en el dendograma b) de la figura 11.

Tabla 8. Datos generales de los experimentos de hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k de las muestras de aRNA-biotina provenientes de los 12 individuos de los subgrupos clínicos NO DM2/TBLT y NO DM2/TBPA.

No.	Clave del Paciente	Número del Microarreglo Hibridado	Número del Experimento*
1	16-NO DM2/TBLT	04	1 y 2
2	15-NO DM2/TBLT	04	3 y 4
3	17-NO DM2/TBLT	05	5 y 6
4	18-NO DM2/TBLT	05	7 y 8
5	20-NO DM2/TBLT	06	9 y 10
6	12-NO DM2/TBLT	06	11 y 12
7	23-NO DM2/TBPA	14	13 y 14
8	24-NO DM2/TBPA	14	15 y 16
9	25-NO DM2/TBPA	15	17 y 18
10	26-NO DM2/TBPA	15	19 y 20
11	21-NO DM2/TBPA	18	21 y 22
12	22-NO DM2/TBPA	18	23 y 24

* Experimentos correspondientes a los indicados en el dendograma de la figura 14 generado con respecto a los individuos de los dos subgrupos clínicos indicados. NO DM2: sin diabetes mellitus tipo 2; TBLT: tuberculosis latente; TBPA: tuberculosis pulmonar activa.

En la tabla 9 se señala el número del experimento hibridación al microarreglo que corresponde a cada uno de los 6 pacientes de los subgrupos clínicos DM2/TBLT y DM2/TPBA indicados en el dendograma b) de la figura 12.

Tabla 9. Datos generales de los experimentos de hibridación al microarreglo CustomArray 4x2k de las muestras de aRNA-biotina provenientes de los 12 individuos de los subgrupos clínicos DM2/TBLT y DM2/TBPA.

No.	Clave del Paciente	Número del Microarreglo Hibridado	Número del Experimento*
1	45-DM2/TBLT	01	1 y 2
2	43-DM2/TBLT	01	3 y 4
3	46-DM2/TBLT	02	5 y 6
4	42-DM2/TBLT	02	7 y 8
5	44-DM2/TBLT	03	9 y 10
6	41-DM2/TBLT	03	11 y 12
7	51-DM2/TBPA	11	13 y 14
8	52-DM2/TBPA	11	15 y 16
9	53-DM2/TBPA	12	17 y 18
10	54-DM2/TBPA	12	19 y 20
11	55-DM2/TBPA	13	21 y 22
12	56-DM2/TBPA	13	23 y 24

* Experimentos correspondientes a los indicados en el dendrograma de la figura 15 generado con respecto a los individuos de los dos subgrupos clínicos estudiados. DM2: diabetes mellitus tipo 2; TBLT: tuberculosis latente; TBPA: tuberculosis pulmonar activa.

VI.13. Análisis de la imagen resultante y extracción de los datos de hibridación. Una vez que se obtuvieron las lecturas de los microarreglos hibridados mediante el lector GenePix 4100A, las imágenes resultantes se digitalizaron y analizaron con el fin de eliminar los artefactos que pudiesen tener los microelectrodos en donde se llevó a cabo la hibridación.

En el centro de la imagen a) de la figura 8, se observa un artefacto cubriendo a dos de los microelectrodos del arreglo; los artefactos deben eliminarse para no alterar los valores de las señales de hibridación general en el microarreglo. En esta misma imagen se puede observar, en las áreas indicadas por un círculo, la localización de las señales de hibridación correspondiente a los "Spike

controls” de *Arabidopsis thaliana* # 4 y # 6 (LTP4 y XCP2). Es importante hacer notar que en los microelectrodos que corresponden a la sonda del “Spike controls” de *Arabidopsis thaliana* # 2 (en medio de los otros dos “Spike controls”), no se observa señal de hibridación. Lo anterior se debe a que el programa para el diseño de las sondas “CombiMatrix Probe Design Software System” no encontró una secuencia óptima para este blanco. Sin embargo, para los propósitos generales, fue suficiente la utilización de los otros dos “Spike controls” (LTP4 y XCP2) como controles positivos heterólogos de hibridación al microarreglo.

En la imagen b) de la misma figura 8, se pueden observar los 4 sectores del chip # 4 hibridado con las muestras cRNA-biotina/spikes de los pacientes 16-NO DM2/TBLT y 15-NO DM2/TBLT. Los dos primeros sectores se hibridaron con muestras del primer individuo, mientras que los sectores 3 y 4 con material del segundo.

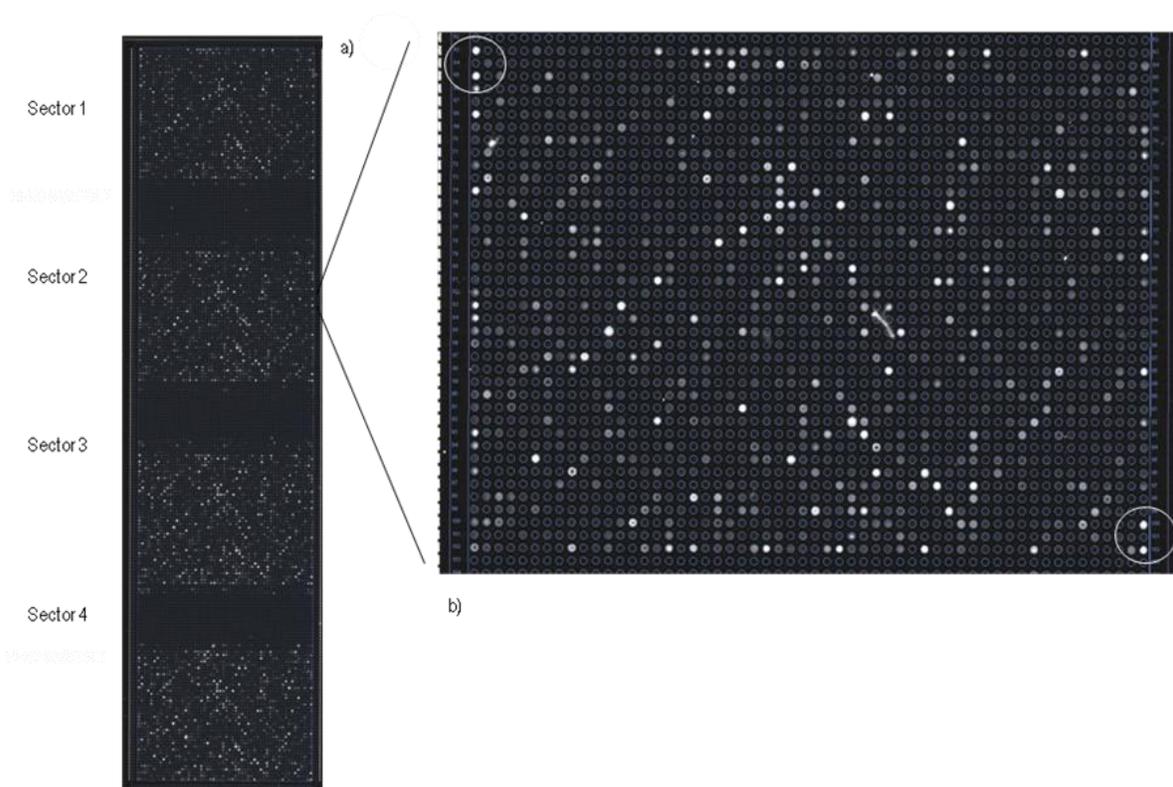


Figura 8. Imagen digitalizada de los resultados de hibridación de muestras de cRNA-globina/spikes a un microarreglo 4x2k de CombiMatrix. a) se muestran los 4 sectores hibridados del chip (dos por paciente) separados por regiones oscuras de no hibridación (zonas sin secuencias blanco). b) ampliación de la imagen de uno de los cuatro sectores del chip mostrando un artefacto al centro y con círculos las señales de hibridación de los microelectrodos con controles positivos heterólogos "spike controls".

VI.14. Análisis estadístico de los datos obtenidos por microarreglos.

VI.14.1. Genes diferencialmente expresados.

VI.14.1.i. Gráficas de SAM. Para la validación estadística de los resultados de hibridación se utilizó el programa "Statistical Analysis for Microarrays" (SAM). En la figura 9 se muestra la gráfica obtenida del análisis estadístico hecho por SAM de los datos de expresión del subgrupo de pacientes NO DM2/TBPA, en donde se muestran tanto los genes inducidos (en color rojo) como los genes reprimidos en su expresión (en color verde) con significancia estadística, con respecto a pacientes NO DM2/TBLT. En ambos grupos de genes se pueden observar algunos de ellos (en color negro) cuya expresión no presentó significancia

estadística. En la parte central, entre los genes inducidos y los genes reprimidos, se ubican los genes que presentaron un nivel de expresión similar y con significancia estadística en los dos grupos de pacientes. El análisis consideró la substracción de los valores de los resultados de hibridación de los individuos del subgrupo NO DM2/CONTROL, respecto a los individuos del subgrupo NO DM2/TBLT.

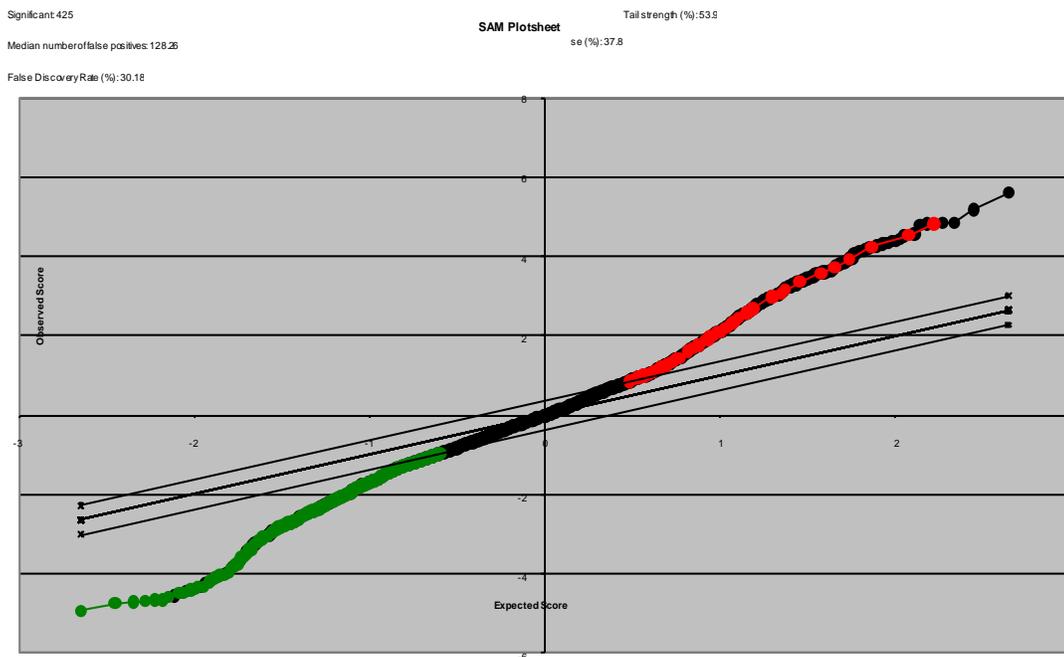


Figura 9. Gráfica de distribución de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes NO DM2/TBPA con respecto al subgrupo NO DM2/TBLT. Genes inducidos (color rojo), genes reprimidos (color verde) y genes sin variación en su expresión (color negro).

En la figura 10 se muestra la gráfica obtenida del análisis estadístico hecho por SAM de los datos de expresión obtenidos en el subgrupo de pacientes DM2/TBPA. Se observan tanto los genes inducidos (en color rojo) como los genes reprimidos (en color verde) con significancia estadística, con respecto a los pacientes DM2/TBLT. Como en la gráfica anterior, en ambos grupos de genes se pueden observar algunos de ellos (en color negro) cuya variación en su expresión no presentó significancia estadística. En la parte central, entre los genes inducidos y los genes reprimidos, se ubican los genes que presentaron niveles de expresión similar y con significancia estadística en los dos subgrupos de pacientes.

También en este caso, el análisis consideró la substracción de los valores de los resultados de hibridación de los individuos del subgrupo DM2/CONTROL, respecto a los individuos del subgrupo DM2/TBLT.

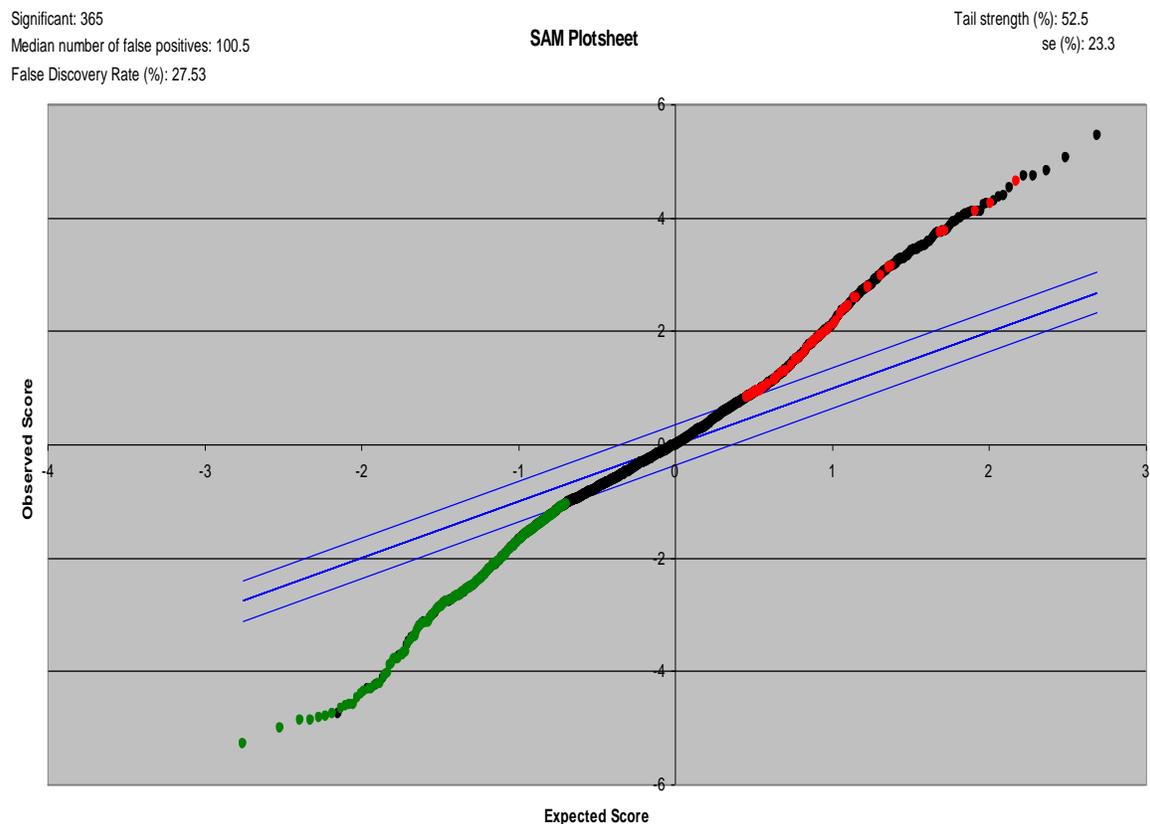


Figura 10. Gráfica de distribución de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con DM2/TBPA con respecto al subgrupo DM2/TBTL. Genes inducidos (color rojo), genes reprimidos (color verde) y genes sin variación en su expresión (color negro).

VI.14.1.ii. Análisis de la agrupación jerárquica de genes. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos en los grupos de pacientes NO DM2, en cuanto a la agrupación jerárquica de los 446 genes, representados en las 2,240 secuencias de oligonucleótidos que conforman cada uno de los cuatro sectores del microarreglo CustomArray 4X2K, en relación a los diferentes niveles de expresión que presenta cada uno de estos genes (a). En el dendrograma se observa la distribución de los grupos de pacientes (b)

agrupados se acuerdo a sus niveles de expresión, diferenciando claramente los individuos que conforman los grupos TBLT y TBPA. Se consideran los resultados de hibridación de 12 experimentos que corresponden a los 6 pacientes con TBLT por duplicado (4 replicados internos). De igual forma, en el clúster de TBPA se agruparon los 12 experimentos que corresponden a los 6 pacientes con TBPA con replicados. Esto indica que los patrones de expresión observados con los ensayos de hibridación a microarreglos definen claramente una diferencia entre los patrones de expresión de cada grupo de pacientes. Así, por ejemplo, la señales de las secuencias correspondientes al gen MMP9 ("Matrix metallopeptidase 9") se distinguen claramente inducidas en el grupo de pacientes con TBPA para todas las muestras de este grupo, mientras que la expresión de este gen está claramente reprimida en el grupo de TBLT.

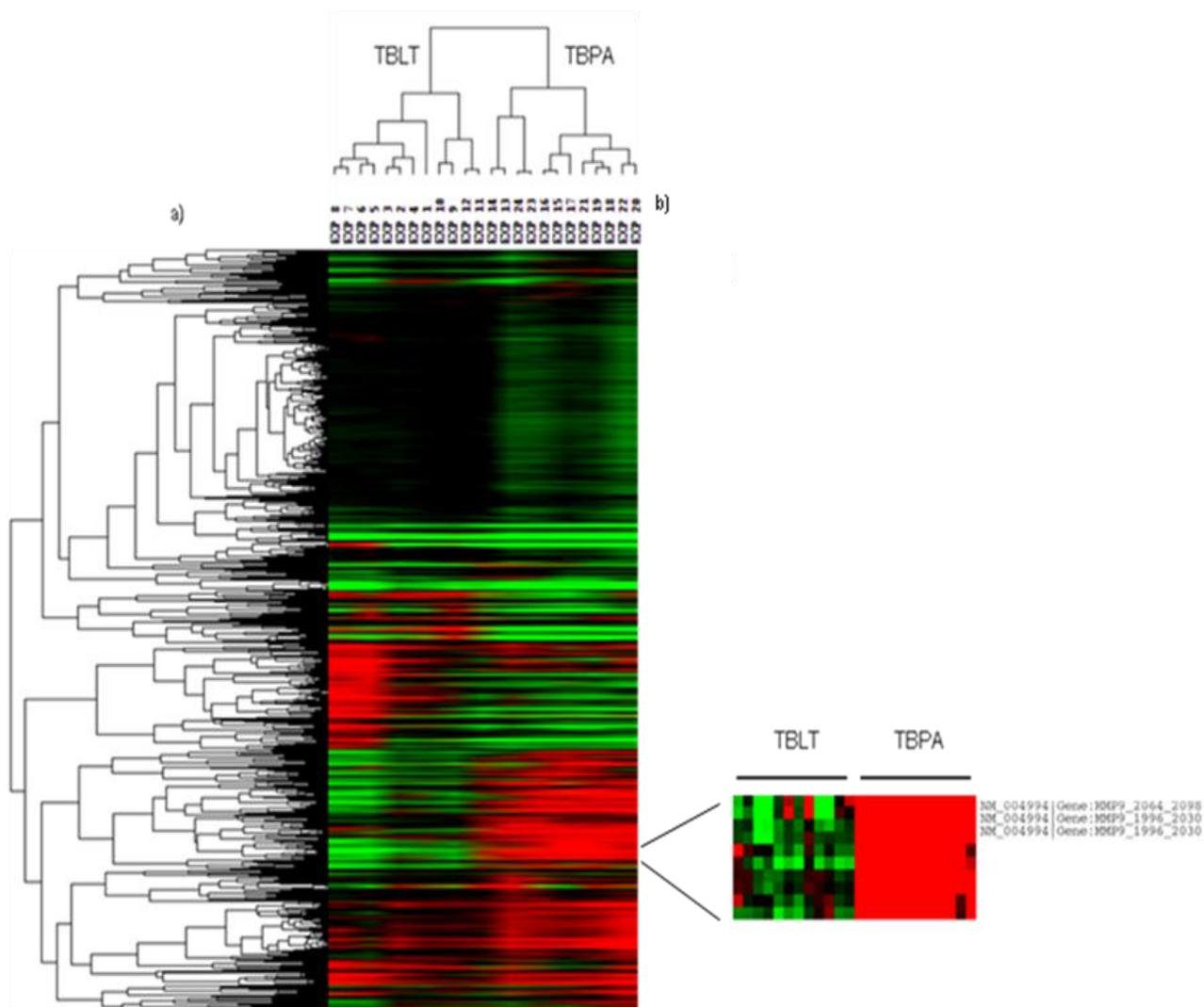


Figura 11. Agrupación jerárquica de los genes diferencialmente expresados en TBLT y TBPA en pacientes NO DM2.

Los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con DM2, en cuanto a la agrupación jerárquica de los 446 genes, representados en las 2,240 secuencias de oligonucleótidos que conforman cada uno de los cuatro sectores del microarreglo CustomArray 4X2K, en relación a los diferentes niveles de expresión que presenta cada uno de estos genes se muestran en el dendrograma a) de la figura 12. En esta figura se puede observar también que el programa distingue entre los grupos de individuos TBLT y TBPA, a excepción de tres pacientes que se ubicaron en un subgrupo localizado dentro de estos dos grupos (dendrograma b).

Por un lado, se encontró que dos de ellos son pacientes con TBPA que pertenecen al subgrupo DM2/TBPA (51-DM2/TBPA: P19 y 53-DM2/TBPA: P21) (experimentos 13-14 y 17-18 respectivamente de la figura 12). Al analizar nuevamente la historia clínica de estos dos casos, se encontró que al momento de la toma sanguínea para realizar los estudios de expresión por microarreglos, por lo menos el segundo de estos pacientes ya había tomado tratamiento antifímico por un mes, mientras que para el primero de ellos no se encontró registro de tratamiento.

Por otro lado, en este mismo subgrupo se ubicó un paciente con TBLT perteneciente al subgrupo DM2/TBLT con registro 43-DM2/TBPA (P8) (experimentos 3 y 4 de la figura 12). Se trata de un paciente femenino de 49 años de edad con DM2 bien controlada (HbA1C: 3.15%) con 7 años de evolución, BAAR y cultivo MTB negativos, PPD positivo (20 mm), QTF-Gold positivo, con cuadro clínico no compatible a TBPA e imagen radiográfica de tórax normal. Las muestras sanguíneas para realizar los estudios de microarreglos de este paciente se tomaron el 25 de abril del 2006. Debido a que esta paciente se ubicó en dicho subgrupo (subgrupo ubicado entre los dos grupos de pacientes con TBLT y TBPA dentro del dendrograma), y con una aparente tendencia hacia TBPA (sugiriendo un estado de progresión), el 30 de junio del 2008, es decir 2 años y dos meses después de la primera toma, se realizó una visita al domicilio de dicha paciente en la cual se tomó una segunda toma sanguínea con registro (P61) con el fin de determinar, mediante RT-PCR en tiempo real, un posible perfil de expresión de progresión a TBPA a partir del grupo de 11 genes determinado por microarreglos. En esta segunda visita la paciente no presentó ninguna sintomatología sugestiva a TBPA; sin embargo, la placa de rayos X de tórax mostró cierta anormalidad, sugiriendo una posible progresión hacia la infección pulmonar activa.

Es muy importante el caso del paciente con clave 55-DM2/TBPA (P23) del subgrupo DM2/TBPA (experimentos 21 y 22 de la figura 12) en el sentido de que representa un caso claro de progresión de TBLT a TBPA que se logró identificar en el presente estudio y corroborado posteriormente por RT-PCR en tiempo real. Se trata de un paciente femenino de 60 años de edad con DM2 mal controlada (HbA1C: 6.8%) y con 15 años de evolución. En julio del 2006 reunía prácticamente todos los criterios para integrar el subgrupo

DM2/TBLT (cuadro clínico negativo a TBPA, PPD: 15 mm, QFT-Gold positivo, BAAR y cultivo MTB de expectoración: negativos), excepto por presentar en la placa de rayos X de tórax una imagen anormal compatible con TBPA, razón por lo cual no se integró al estudio de microarreglos. Sin embargo, las muestras sanguíneas tomadas en tubos PAXgene se conservaron a -80°C para una posible utilización posterior. El 7 de noviembre del 2007, es decir, 1 año 4 meses después la paciente fue hospitalizada con un cuadro clínico sugestivo a TBPA, QFT-Gold positivo, placa de tórax anormal sugestiva a TBPA, y con un resultado positivo a BAAR obtenido a partir de una muestra de aspirado bronquio-alveolar con el cual se confirmó el diagnóstico de TBPA integrándose al subgrupo DM2/TBPA en el estudio de microarreglos (55-DM2/TBPA). Esta paciente que inicialmente presentaba tuberculosis latente desarrolló la infección activa en el transcurso de 16 meses. Después del tratamiento antifímico y una vez que la paciente fue dada de alta por su médico tratante, se le tomó una muestra de sangre con el propósito de determinar su perfil transcripcional mediante RT-PCR en tiempo real (P63); a la muestra obtenida en la fase latente de la infección obtenida en julio del 2006 también se le determinó el perfil transcripcional mediante RT-PCR en tiempo real (P62) con el fin de determinar el posible perfil de progresión hacia TBPA.

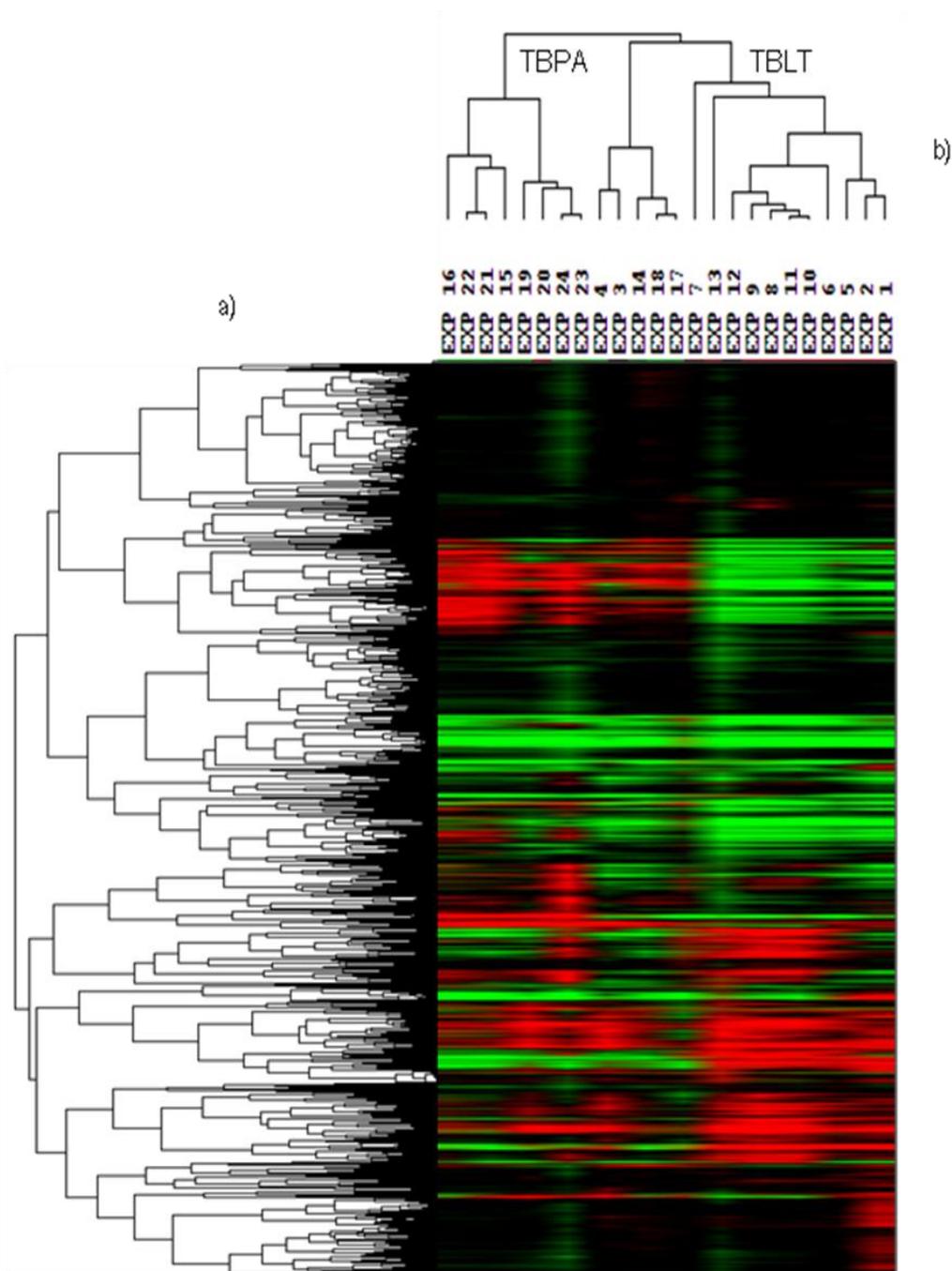


Figura 12. Agrupación jerárquica de los genes diferencialmente expresados en TBLT y TBPA en pacientes con DM2.

VI.14.2. Lista de genes sobreexpresados con significancia estadística en los subgrupos de pacientes NO DM2/TBPA y DM2/TBPA generados por SAM. Para el subgrupo de pacientes NO DM2/TBPA el programa “SAM” generó, en relación al grupo NO DM2/TBLT, una lista de 103 genes sobre expresados y con significancia estadística con valores de “ q ” de entre 0 y 8.27 los cuales están representados por un total de 186 secuencias de oligonucleótidos presentes en el microarreglo 4X2K de CombiMatrix. Para el subgrupo de pacientes DM2/TBPA se identificó un total de 13 genes sobre expresados y con significancia estadística con valores de “ q ” de entre 0 y 30.17, los cuales están representados por un total de 70 secuencias de oligonucleótidos presentes en el microarreglo

Para definir algunos de los genes mayormente expresados en ambos subgrupos de pacientes se realizó un análisis al interior de los datos generados por “SAM” en el que se seleccionaron sólo aquellas secuencias con un alto grado de significancia estadística, es decir, con valores de “ q ” entre 0 y 1.0; entre más se acerca el valor “ q ” a 0, es más significativo.

En la tabla 10 se señala el grupo de genes sobreexpresados y con significancia estadística (con valores de “ q ” entre 0 y 1.0), tanto del subgrupo de pacientes NO DM2/TBPA como del subgrupo DM2/TBPA, respecto a los pacientes NO DM2/TBLT y DM2/TBLT respectivamente. Se indica, además, el proceso biológico en el que participa cada uno de estos genes.

En el subgrupo NO DM2/TBPA, los 103 genes que se sobreexpresaron y que presentaron un valor de “ q ” entre de 0-0.94, están representados en un total de 148 secuencias de oligonucleótidos presentes en el microarreglo; estos genes presentaron un nivel del cambio de expresión o “Fold change” entre 5 y 604, en relación a los valores de expresión obtenidos a partir de los pacientes NO DM2/TBLT.

En cuanto al subgrupo de pacientes DM2/TBPA 13 se sobreexpresaron y tuvieron significancia estadística con valores de “ q ” oscilaron entre 0 y 0.63. Para estos genes, los cuales están representados por un total de 19 secuencias de oligonucleótidos presentes en el microarreglo, el nivel del cambio de expresión o “Fold change” osciló entre 6.2 y 553, en relación a los valores de expresión obtenidos a partir de los pacientes DM2/TBLT.

De los 13 genes sobreexpresados en el subgrupo DM2/TBPA, 11 son comunes a los 103 genes sobreexpresados en el subgrupo NO DM2/TBPA (indicados con asterisco al final de la tabla 10). Ya que estos 11 genes se encuentran sobreexpresados en los dos subgrupos grupos clínicos, es posible que pudiesen servir como predictores de progresión de TBLT a TBPA en ambos grupos de pacientes. Con el fin de conocer si esto es posible, la población total del estudio se estudió mediante RT-PCR en tiempo real.

Tabla 10. Genes sobreexpresados y con significancia estadística identificados por microarreglos en los subgrupos de pacientes NO DM2/TBPA y DM2/TBPA generados por el programa SAM.

No.	Gen	Proceso Biológico Involucrado	Subgrupo Clínico
1	CYBA	Respuesta inmune innata, proceso de biosíntesis de peróxido de hidrogeno, respuesta inflamatoria y liberación de superóxido.	NO DM2/TBPA
2	RAB20	Traducción de señales mediadas por pequeñas GTPasas y transporte de proteínas.	"
3	MMP9	Regulación positiva en la migración de queratinocitos, proteólisis, proceso catabólico de colágeno, organización de la matriz extracelular y sistema esquelético.	"
4	GADD45B	Apoptosis, respuesta al estrés, regulación negativa de la actividad de la proteincinasa, regulación del ciclo celular, activación de la actividad de MAPKK.	"
5	ICAM1	Adhesión celular mediada por integrinas mediante la unión al receptor de superficie celular del huésped, activación de células T, adhesión leucocitaria y migración de leucocitos.	"
6	YWHAZ	Traducción de señales y anti-apoptosis.	"
7	SEMA4D	Respuesta inmune, adhesión celular, regulación positiva de axonogénesis, diferenciación celular, desarrollo del sistema nervioso y Anti-apoptosis.	"
8	GRINA	Desconocido	"
9	SLC11A1	Transporte, respuesta inmune, respuesta a bacterias, transporte del ion hierro, transporte de iones.	"
10	ADAM8	Proteólisis y adhesión de célula a célula.	"
11	TGFB1	Regulación de la diferenciación de células T, regulación negativa de la respuesta inmune, inducción de apoptosis, regulación negativa de la fagocitosis, regulación positiva de la producción de interleucina 17.	"
12	CD151	Percepción sensorial de sonido y adhesión celular.	"
13	TNFAIP2	Diferenciación celular, angiogénesis, desarrollo de organelos multicelulares.	"
14	NFKBIA	Vía de señalización mediada por lipopolisacárido, apoptosis, regulación de la proliferación celular, respuesta a lipopolisacárido, interacción de organismos entre especies.	"
15	HAL	Proceso catabólico de la histidina y procesos de biosíntesis.	"
16	CFP	Activación de la vía alternativa del complemento y respuesta de defensa a bacterias.	"
17	PTDSS1	Proceso de biosíntesis de la fosfatidilserina y proceso de biosíntesis de fosfolípidos.	"

Tabla 10. Continuación.

No.	Gen	Proceso Biológico Involucrado	Subgrupo Clínico
18	GBP1	Respuesta inmune.	"
19	DEFB1	Respuesta de defensa a bacterias, respuesta inmune innata, quimiotaxis, vía de señalización del receptor acoplado a proteínas G.	"
20	PGLYRP1	Detección de bacterias, respuesta inmune innata, proceso catabólico de peptidoglicanos y respuesta de defensa a bacterias Gram positivas.	"
21	STAT1	Transcripción del promotor de la RNA polimerasa II, interacción de organismos entre especies, respuesta a virus, regulación de la transcripción dependiente de DNA, activación de caspasas, fosforilación de tirosina de la proteína STAT, traducción de señales y cascada I-kappa B cinasa/NF-kappa B.	"
22	UQCRC1	Proteólisis, respiración aeróbica, transporte, fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones.	"
23	VAV1	Regulación de la actividad de la GTPasa, respuesta inmune, regulación positiva de la adhesión celular, cascada de señalización intracelular, vía de señalización mediada por integrinas y fagocitosis.	"
24	VNN1	Respuesta al estrés oxidativo, respuesta a la inflamatoria aguda, adhesión célula-célula, regulación positiva de la diferenciación de células T en el timo, motilidad celular, respuesta inmune innata.	"
25	IL15	Señalización célula-célula, respuesta inmune, regulación positiva de proliferación celular y transducción de señales.	"
26	MX1	Traducción de señales, respuesta a virus, respuesta de defensa e inducción de apoptosis.	"
27	KIAA0220	Desconocido.	"
28	CTPS	Proceso metabólico de la glutamina, proceso de biosíntesis de CTP, proceso de biosíntesis del nucleótido pirimidina, nucleobase, nucleósido, nucleótido y proceso metabólico de ácido nucleico.	"
29	TLR4	Regulación positiva del proceso de biosíntesis de interleucina 8, regulación positiva del proceso de biosíntesis de interleucina 12, regulación positiva de producción de TNF y respuesta inmune innata.	"
30	IFIT1	Desconocido.	"
31	ATF3	Regulación de transcripción dependiente de DNA y gluconeogénesis.	"
32	GBP4	Respuesta inmune.	"
33	CASP1	Transducción de señales, regulación positiva de la cascada I-kappa B cinasa/NF-kappa B, regulación de apoptosis y proteólisis.	"
34	TCF1	Regulación positiva de la transcripción dependiente de DNA, regulación de transcripción específica para el promotor de RNA polimerasa II y homeostasis de la glucosa.	"

Tabla 10. Continuación.

No.	Gen	Proceso Biológico Involucrado	Subgrupo Clínico
35	AIF1	Regulación negativa de la proliferación celular, paro del ciclo celular, respuesta inflamatoria, formación de filamentos de actina y respuesta a estrés.	"
36	PSTPIP1	Adhesión celular y transducción de señales.	"
37	CD53	Transducción de señales.	"
38	EREG	Regulación positiva de la replicación de DNA, morfogénesis de órganos, regulación positiva del proceso de biosíntesis de interleucina 6, angiogénesis, regulación positiva de la respuesta inmune innata.	"
39	MKI67	Ciclo celular y proliferación celular.	"
40	AGTR1	Regulación de la vasoconstricción, desarrollo renal, regulación positiva de respuesta inflamatoria, regulación del crecimiento celular y regulación de la proliferación celular.	"
41	IBRDC3	Proceso catabólico de proteínas dependientes de ubiquitina y respuesta inmune.	"
42	CLU	Desarrollo endocrino del páncreas, respuesta inmune innata, respuesta al estrés oxidativo, activación del complemento por la vía clásica, regulación positiva de la diferenciación celular y Apoptosis.	"
43	PLAUR	Regulación de proteólisis, anclaje de GPI a proteínas, transducción de señales, quimiotaxis, coagulación sanguínea y motilidad celular.	"
44	FN1	Proceso metabólico, regulación de la estructura celular, migración celular, respuesta a heridas, unión cruzada de péptidos, respuestas de fase aguda, vía de señalización del receptor de proteínas transmembranales de tipo tirosin-cinasa y adhesión celular.	"
45	TIMP1	Regulación positiva de la proliferación celular, regulación negativa de la proteólisis del ectodominio de proteínas de membrana y maduración del eritrocito.	"
46	CTSB	Proteólisis, respuesta a heridas, regulación de actividad catalítica y regulación de la apoptosis.	"
47	IL18BP	Respuesta inmune de tipo Th1.	"
48	APOBEC1	Proceso de biosíntesis de lipoproteínas A, modificación del RNA mensajero, edición de citidina a uridina.	"
49	CXCL5	Transducción de señales, señalización célula-célula, respuesta inmune, quimiotaxis, regulación positiva de la proliferación celular.	"
50	MMP12	Probablemente se encuentra involucrado en el daño y remodelación tisular.	"
51	SNX10	Desconocido.	"

Tabla 10. Continuación.

No.	Gen	Proceso Biológico Involucrado	Subgrupo Clínico
52	C1QC	Activación del complemento por la vía clásica, regulación negativa de diferenciación de granulocitos, regulación negativa de diferenciación de macrófagos y respuesta inmune innata.	"
53	CLEC4E	Respuesta inmune.	"
54	IFIH1	Regulación de apoptosis, respuesta a virus, respuesta inmune innata, interacción de organismos entre especies.	"
55	RNF149	Proceso catabólico de proteínas dependiente de ubiquitina.	"
56	GLRX	Cadena de transporte de electrones, transporte y homeostasis redox en la célula.	"
57	LOX	Proceso de modificación de proteínas, ensamble de fibras elásticas, oxidación-reducción, desarrollo de vasos sanguíneos, organización de fibras de colágena y desarrollo pulmonar.	"
58	TNFSF11	Desarrollo de organismos pluricelulares, respuesta inmune, diferenciación celular, regulación positiva de la reabsorción del hueso, regulación positiva de la diferenciación de osteoclastos.	"
59	CTSS	Proteólisis y respuesta inmune.	"
60	TLR3	Regulación positiva de interferón gama, regulación positiva del proceso de biosíntesis de quimiocinas, respuesta inflamatoria, producción de TNF y respuesta inmune innata.	"
61	MARCKSL1	Desconocido.	"
62	CCL3	Transducción de señales, señalización célula-célula, vía de señalización del receptor de proteínas acoplado a proteína G, respuesta inmune, respuesta inflamatoria y quimiotaxis.	"
63	ACP5	Desconocido.	"
64	SOD2	Proceso metabólico de superóxido, oxidación-reducción, regulación de la presión sanguínea, eliminación de radicales de superóxido, regulación negativa de la apoptosis, respuesta a peróxido de hidrogeno.	"
65	GHRL	Regulación positiva en la secreción de insulina, regulación negativa de la producción de interleucina 1-beta, regulación de la proliferación celular, regulación positiva del apetito, comportamiento en la alimentación del adulto.	"
66	TNFRSF1B	Regulación negativa en la respuesta inflamatoria, muerte celular, apoptosis, respuesta inmune, receptores de superficie celular relacionado a la traducción de señales y desestabilización de RNA.	"
67	XDH	Regulación de la diferenciación de células epiteliales, lactancia, resorción del hueso, respuesta al ion aluminio, oxido-reducción.	"
68	PILRB	Activación de la actividad tirosin-cinasa de la proteína receptora transmembranal.	"

Tabla 10. Continuación.

No.	Gen	Proceso Biológico Involucrado	Subgrupo Clínico
69	TRAF1	Transducción de señales, ensamble de complejos proteicos y regulación de apoptosis.	"
70	F3	Vía extrínseca de la coagulación sanguínea.	"
71	CTSW	Respuesta inmune y proteólisis.	"
72	IRF7	Regulación de la transcripción dependiente de DNA, regulación negativa de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II, transcripción, respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas.	"
73	CYBB	Liberación de superóxido, transportador de iones, estallido respiratorio, respuesta inmune innata y respuesta inflamatoria.	"
74	CSPG2	Desarrollo del corazón, desarrollo de organismos multicelulares, adhesión celular y reconocimiento celular.	"
75	DEFB103A	Respuesta de defensa contra bacterias, regulación positiva en el proceso de biosíntesis de péptidos antimicrobianos en contra de bacterias gram positivas.	"
76	FKBP4	Diferenciación del sexo masculino, localización de complejos proteicos, ensamble del complejo de receptores de hormonas esteroideas, plegado de proteínas, implantación embrionaria, ion cobre y transporte.	"
77	KIT	Vía de señalización del receptor transmembrana de proteínas tirosin-cinasa, fosforilación de peptidil tirosina, respuesta a la radiación, vía de señalización mediada por citocinas.	"
78	MT1B	Desconocido	"
79	SEZ23A	No clasificado.	"
80	PTGER4	Traducción de señales, respuesta inmune, vía de señalización del receptor de proteínas acoplado a proteína G, regulación de osificación, señalización del nucleótido cAMP del segundo mensajero acoplado a proteína G.	"
81	CCL15	Señalización célula-célula, respuesta inmune, traducción de señales, homeostasis del ion calcio celular y quimiotaxis.	"
82	RIPK2	Transducción de señales, respuesta inflamatoria, proliferación de células T, fosforilación de aminoácidos y regulación positiva de apoptosis.	"
83	DEFB4	Respuesta inmune, quimiotaxis, vía de señalización del receptor de proteínas acoplado a proteína G y respuesta de defensa contra bacterias.	"
84	ADORA2B	Activación de la actividad de la adenilato ciclasa, activación de la actividad de las MAPK, cascada JNK, vía de señalización del receptor de proteínas acoplado a proteína G, transducción de señales y regulación de la angiogénesis.	"
85	CXCL13	Señalización célula-célula, respuesta inflamatoria, respuesta inmune, incremento de la concentración del ion calcio en el citosol, quimiotaxis, formación del nódulo linfático.	"
86	CAPG	Ensamble de complejos proteicos.	"
87	NCF2	Estallido respiratorio, respuesta de defensa celular, liberación de superóxido y respuesta inmune innata.	"
88	BIRC1	Apoptosis, Anti apoptosis y desarrollo del sistema nervioso.	"

Tabla 10. Continuación.

No.	Gen	Proceso Biológico Involucrado	Subgrupo Clínico
89	RPL37	Elongación translacional.	"
90	IL10	Regulación negativa de interleucina 12, regulación negativa de proliferación de células T, respuesta a moléculas de origen bacteriano y quimiotaxis de leucocitos.	"
91	DEFA1	Respuesta a virus, respuesta inmune, respuesta de defensa contra hongos, respuesta de defensa contra bacterias, quimiotaxis y proceso metabólico xenobiótico.	"
92	DEFA3	Respuesta a virus, respuesta de defensa contra bacterias, respuesta de defensa contra hongos, proceso metabólico xenobiótico.	"
93	IGSF6	Transducción de señales ligadas a receptores de superficie y respuesta inmune.	DM2/TBPA
94	MT2A	Homeostasis celular de iones cooperadores.	"
95	BASP1*	Desconocido.	"
96	HP*	Homeostasis celular del ion hierro, proteólisis y respuesta de defensa.	"
97	IL1RN*	Respuesta inflamatoria, respuesta al estímulo por glucocorticoides y respuesta inmune.	"
98	TACC3*	Regulación del ciclo celular, neurogénesis, proliferación celular, regulación de procesos basados en microtubulos, organización de microtubulos del citoesqueleto, respuesta a estrés y hemopoyesis.	"
99	NINJ1*	Desarrollo del sistema nervioso, adhesión celular y regeneración tisular.	"
100	IL8RA*	Vía de señalización de receptores de proteínas acoplados a proteína G y quimiotaxis, respuesta inflamatoria.	"
101	CCR1*	Respuesta inflamatoria, adhesión celular, incremento en la concentración del ion calcio en citoplasma, respuesta inmune, señalización célula-célula, vía de señalización mediada por citocinas y quimiotaxis.	"
102	ITGB2*	Vía de señalización mediada por integrinas, migración de células endoteliales, activación de células NK, adhesión de matriz celular, adhesión leucocitaria, migración leucocitaria durante la respuesta inflamatoria.	"
103	IRF1*	Regulación positiva de biosíntesis de interleucina 12, regulación negativa del ciclo celular, CD8 positivos, diferenciación de células T alfa y beta y regulación de la expresión genética.	"
104	CD14*	Traducción de señales ligadas a receptores de superficie celular, apoptosis, fagocitosis, respuesta inflamatoria, respuesta inmune y respuesta a moléculas de origen bacteriano.	"
105	PSMB8*	Regulación negativa de la actividad ligasa de la ubiquitina durante la mitosis del ciclo celular, respuesta inmune, proceso catabólico de proteínas dependiente de ubiquitina.	"

* Genes sobreexpresados comunes en los subgrupos clínicos NO DM2/TBPA y DM2/TBPA.

La tabla 11 contiene la lista de 11 genes que se sobreexpresaron con significancia estadística con valor de “q” de 0-1 tanto en el subgrupo de pacientes NO DM2/TBPA como en el subgrupo DM2/TBPA, en relación a pacientes con TBLT. Se indica el símbolo y la función biológica de cada gene.

Tabla 11. Función biológica de los genes sobreexpresados en ambos subgrupos de pacientes NO DM2/TBPA y DM2/TBPA identificados por microarreglos.

No.	Gen	Función Biológica
1	BASP1	Desconocida.
2	HP	La haptoglobina se combina con la hemoglobina libre en plasma previniendo la pérdida de hierro a través de los riñones y protegiéndolos del daño por la hemoglobina, haciendo a la hemoglobina accesible a las enzimas degradadoras.
3	IL1RN	Inhibe la actividad de la IL1 uniéndose a su receptor. No presenta actividad como la IL1.
4	TACC3	Puede estar involucrado en el control del crecimiento y diferenciación celular. Puede contribuir al cáncer.
5	NINJ1	Molécula de adhesión celular homofílica que promueve el crecimiento de los axones. Puede jugar un papel en la regeneración nerviosa y en la formación y función de otros tejidos.
6	IL8RA	Receptor de la IL8 el cual es un poderoso factor quimiotáctico de neutrófilos. Al unirse la IL8 a su receptor provoca la activación de los neutrófilos.
7	CCR1	Receptor para las quimiocinas tipo C-C.
8	ITGB2	La integrina alfa-I/beta-2 es un receptor para ICAM1, ICAM2, ICAM3 e ICAM4.
9	IRF1	Se une específicamente a la región reguladora corriente arriba del IFN tipo I y a los genes MHC clase I inducibles por IFN (la secuencia consenso del interferón “ICS”) activando dichos genes.
10	CD14	Coopera con MD-2 y TLR4 para mediar la respuesta inmune innata a los lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Actúa vía MYD88, TIRAP y TRAF6, conduciendo a la activación de NF-kappa-B, secreción de citocinas y de la respuesta inflamatoria.
11	PSMB8	El proteosoma es un grupo de proteinasas catalíticas las cuales se caracterizan por su habilidad para romper péptidos con arg, phe, tyr, leu, y glu adyacentes al grupo liberado a un pH neutro o ligeramente básico.

VI.15. Ensayos de RT-PCR en tiempo real. Con el fin de corroborar los niveles de expresión diferencial de genes en los grupos NO DM2 y DM2 sobreexpresados en los pacientes TBPA, en relación con los individuos TBLT identificados por los estudios de microarreglos, se utilizó la plataforma de RT-PCR en tiempo real, la cual nos permite medir de una forma más precisa y sensible la expresión genética diferencial

en las muestras de los pacientes estudiados. Los ensayos de RT-PCR en tiempo real representan la metodología más ampliamente utilizada para validar los resultados obtenidos por microarreglos.

VI.15.1. Determinación del gen constitutivo de referencia. Después de calcular la desviación estándar de cada uno de los 44 genes constitutivos incluidos como controles positivos autólogos de hibridación en el microarreglos 4X2K de CombiMatrix, se concluyó que uno de los genes que presentaba menor variación en su nivel de expresión en los 36 individuos que integraron el estudio de microarreglos, fue el gene constitutivo HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase). De tal forma que en los ensayos de RT-PCR en tiempo real se realizaron utilizando el gene HPRT de humano como gen de referencia.

VI.15.2. Sondas e iniciadores usados en la amplificación de los genes problema. Mediante el programa "ProbeFinder" de Roche se diseñaron los iniciadores para el gene constitutivo HPRT y para 10 de los 11 genes que se sobreexpresaron en los individuos con TBPA en relación a los individuos con TBLT en los dos grupos de pacientes estudiados (NO DM2 y DM2) identificados por microarreglos. En la tabla 12 se indica la secuencia nucleotídica de los diferentes iniciadores tanto sentido como antisentido, así como el número de la sonda empleada para el correspondiente gen a amplificar por RT-PCR en tiempo real.

Tabla 12. Sondas y secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación por RT-PCR en tiempo real de 10 genes identificados por microarreglos.

Gen	Número de sonda*	Iniciador sentido	Iniciador antisentido
HP	37	aggcaagaccaaccaagatg	agtccactgcaaaaagctgctc
IL1RN	16	tgctgtcctgtgtcaagtc	tctcgctcaggcagtgatg
TACC3	6	tggacaggttcgaagaggtt	gcttggaagttcctctctgc
NINJ1	27	accccagcagtaggacacc	ctcacaggtatggcgactcc
IL8RA	17	gctgtaagtcactctgatctctgac	tcagtttcagcaatggttgat
CCR1	81	tgatcaccagcatcatca	tataagcctggcatggaagc
ITGB2	27	gctgtccccacaaaagtg	ccggaaggcagcgttgaa
IRF1	36	gagctgggccattcacac	ttggcctccacgtcttg
CD14	74	gttcggaagacttatcgacat	acaaggttctggcgtggt
PSMB8	86	gttcagcatggagtgattg	tggtcaccgtaaggcacta

* Biblioteca de sondas de humano (Universal Probe library Set Human) (Roche, Inc. USA).

VI.15.3. Concentración de las muestras de cDNA sintetizadas a partir de RNA libre de transcritos de globina. En la tabla 13 se indica la concentración obtenida de las muestras de cDNA de los 60 individuos que conforman los seis subgrupos clínicos. Se señala, entre otros datos, el número de registro asignado a cada paciente en los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Tabla 13. Concentración de las muestras de cDNA sintetizadas a partir de RNA libre de transcritos de globina de los 60 individuos que conforman los 6 subgrupos clínicos para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Clave	Registro General	Registro Ensayos qRT-PCR	Concentración cDNA (ng/μl)
01-NO DM2/CONTROL	50-BEN (MA-22)	P01	726
02-NO DM2/CONTROL	144-BEN (MA-76)	P50	426
03-NO DM2/CONTROL	91-BEN (MA-45)	P51	709
04-NO DM2/CONTROL	92-BEN (MA-46)	P52	732
05-NO DM2/CONTROL	93-BEN (MA-47)	P02	800
06-NO DM2/CONTROL	94-BEN (MA-48)	P03	760
07-NO DM2/CONTROL	95-BEN (MA-50)	P04	734
08-NO DM2/CONTROL	139-BEN (MA-71)	P05	692
09-NO DM2/CONTROL	140-BEN (MA-72)	P06	655
10-NO DM2/CONTROL	149-BEN (MA-80)	P49	739
11-NO DM2/TBLT	102-BEN (56-MA)	P45	715
12-NO DM2/TBLT	103-BEN (57-MA)	P30	1505
13-NO DM2/TBLT	104-BEN (58-MA)	P46	743
14-NO DM2/TBLT	151-BEN (MA-82)	P47	763
15-NO DM2/TBLT	01-BEN (MA-04)	P26	1524
16-NO DM2/TBLT	05-BEN (MA-01)	P25	1450
17-NO DM2/TBLT	36-BEN (MA-14)	P27	1469
18-NO DM2/TBLT	72-BEN (MA-31)	P28	1447
19-NO DM2/TBLT	90-BEN (MA-44)	P48	756
20-NO DM2/TBLT	82-BEN (MA-36)	P29	1440
21-NO DM2/TBPA	98-BEN (D-084)	P31	1361
22-NO DM2/TBPA	132-BEN (000-123-000)	P32	1468
23-NO DM2/TBPA	156-BEN (D-147)	P33	1419
24-NO DM2/TBPA	157-BEN (D-199)	P34	1422
25-NO DM2/TBPA	162-BEN (00062)	P35	1429
26-NO DM2/TBPA	171-BEN (000-337-000)	P36	1350
27-NO DM2/TBPA	174-BEN (000-262-021)	P53	670
28-NO DM2/TBPA	179-BEN (000-346-000)	P54	622
29-NO DM2/TBPA	180-BEN (000-040-000)	P55	498
30-NO DM2/TBPA	181-BEN (000-348-000)	P56	622

Tabla 13. Continuación.

Clave	Registro General	Registro Ensayos qRT-PCR	Concentración cDNA (ng/μl)
31-DM2/CONTROL	117-BEN (D-025)	P41	765
32-DM2/CONTROL	119-BEN (D-048)	P42	732
33-DM2/CONTROL	67-BEN (5785)	P14	756
34-DM2/CONTROL	68-BEN (5181)	P18	732
35-DM2/CONTROL	69-BEN (5206)	P43	753
36-DM2/CONTROL	78-BEN (3114)	P16	751
37-DM2/CONTROL	79-BEN (1088)	P44	734
38-DM2/CONTROL	80-BEN (2049)	P17	706
39-DM2/CONTROL	81-BEN (4960)	P15	697
40-DM2/CONTROL	51-BEN (MA-27)	P13	784
41-DM2/TBLT	24-BEN (0693)	P12	785
42-DM2/TBLT	15-BEN (4073)	P10	594
43-DM2/TBLT	13-BEN (4941)	P08	701
44-DM2/TBLT	21-BEN (5075)	P11	752
45-DM2/TBLT	11-BEN (5577)	P07	791
46-DM2/TBLT	14-BEN (5606)	P09	778
47-DM2/TBLT	110-BEN (D-001)	P37	732
48-DM2/TBLT	112-BEN (D-004)	P38	716
49-DM2/TBLT	114-BEN (D-009)	P39	735
50-DM2/TBLT	118-BEN (D-028)	P40	766
51-DM2/TBPA	65-BEN (00100)	P19	1445
52-DM2/TBPA	84-BEN (MA-38)	P20	1442
53-DM2/TBPA	109-BEN (000-57-000)	P21	1439
54-DM2/TBPA	160-BEN (D-247)	P22	1410
55-DM2/TBPA	161-BEN (000-220-000)	P23	1478
56-DM2/TBPA	163-BEN (000-227-000)	P24	1481
57-DM2/TBPA	165-BEN (000-232-000)	P58	717
58-DM2/TBPA	166-BEN (000-239-000)	P59	713
59-DM2/TBPA	167-BEN (000-308-000)	P60	727
60-DM2/TBPA	173-BEN (000-340-000)	P57	697

VI.15.4. Rango dinámico. La concentración óptima de cDNA a utilizar en las reacciones de amplificación por RT-PCR en tiempo real para los 10 genes problema fue de 25 ng/μl para las muestras provenientes de los pacientes y de 5 ng/μl para el control positivo compuesto por la mezcla de muestras ("pool") de cDNA de pacientes con TBLT y TBPA con y sin DM2. A esta concentración la amplificación tanto

del gen de referencia constitutivo (HPRT) como de los genes problema se inició entre los valores de “CP” de 28 y 29, asegurando con esto que en todas las muestras de cDNA de los pacientes se lograra detectar la amplificación de todos los genes estudiados, si es que estos se encuentran expresados.

VI.15.5. Datos de la expresión relativa. La diferencia de 1.0 que existe entre el valor de expresión relativa del grupo de pacientes control (con un valor de 1.0) y del grupo de pacientes con TBPA (con un valor base de 2), equivale a un nivel de cambio en la expresión relativa (Fold change) de 2, debido a que los valores de expresión relativa están dadas en una escala logarítmica en base 2; un valor de 2 en el nivel de expresión relativa, significa que existe diferencias biológicas significativas entre los dos subgrupos de pacientes analizados TBLT y TBPA, tal y como se puede apreciar en las gráficas de la figura 13. En las tres gráficas, la mayoría de los pacientes de ambos subgrupos clínicos se separan en el punto del valor de corte de 2, el cual equivale a un nivel de cambio en la expresión relativa (Fold change) de 2 existente entre los dos subgrupos comparados (TBLT y TBPA), en este caso, del grupo de paciente con DM2 (70).

En la tabla 14 se muestran los valores de expresión relativa obtenidos en los 10 genes analizados por RT-PCR en tiempo real e identificados por microarreglos, de los individuos de los subgrupos clínico NO DM2/TBLT (sombreado) y NO DM2/TBPA, en relación al subgrupo de individuos NO DM2/CONTROL. Se incluye la clave del paciente, así como el número de registro en los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Se señala con negritas los valores que no corresponden al subgrupo respectivo.

Tabla 14. Expresión relativa de 10 genes identificados por microarreglos en el grupo de pacientes NO DM2 determinada por RT-PCR en tiempo real.

Gen		HP	IL1-RN	TACC3	NINJ1	IL8-RA	CCR1	ITGB2	IRF1	CD14	PSMB8	
No.	Subgrupo NO DM2/CONTROL*	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
	Clave	Registro qRT-PCR										
1	11-NO DM2/TBLT	P45	2,76	-2,04	1,29	2,56	2,35	2,70	2,04	6,77	-2,35	2,33
2	12-NO DM2/TBLT	P30	-2,81	-12,82	-3,04	-1,55	1,12	1,08	2,01	1,28	-6,23	-1,41
3	13-NO DM2/TBLT	P46	1,42	-4,11	-1,12	1,74	1,57	2,09	1,41	6,25	-2,77	1,74
4	14-NO DM2/TBLT	P47	1,95	-2,62	2,28	3,80	3,22	8,07	4,43	11,88	1,63	3,40
5	15-NO DM2/TBLT	P26	3,63	-5,58	-1,55	1,93	-2,37	3,56	-7,60	-1,05	-2,27	1,15
6	16-NO DM2/TBLT	P25	-1,69	-29,25	1,02	-1,72	-1,02	5,21	4,92	-2,08	-1,96	1,39
7	17-NO DM2/TBLT	P27	-2,28	-18,11	-2,23	-2,19	-3,19	-1,37	1,90	-5,11	-3,93	-1,99
8	18-NO DM2/TBLT	P28	2,05	-10,63	-1,26	1,11	-1,03	1,57	1,14	2,83	-2,60	1,12
9	19-NO DM2/TBLT	P48	1,85	-1,72	1,54	2,86	2,87	4,02	2,19	7,53	-1,62	2,89
10	20-NO DM2/TBLT	P29	-2,41	-50,98	-1,43	-1,47	-3,00	-1,57	-1,32	1,78	-2,98	-1,21
1	21-NO DM2/TBPA	P31	15,83	-2,29	-1,13	2,22	1,54	5,72	2,03	3,85	-1,34	1,78
2	22-NO DM2/TBPA	P32	2,52	-11,26	1,32	2,85	3,07	3,97	2,77	5,86	1,11	2,36
3	23-NO DM2/TBPA	P33	-1,06	-17,39	-1,42	1,35	2,04	2,34	1,77	2,78	-1,61	-1,15
4	24-NO DM2/TBPA	P34	1,57	-9,16	1,54	2,20	1,43	5,37	2,45	4,81	-1,46	1,52
5	25-NO DM2/TBPA	P35	-1,40	-9,23	-1,19	2,43	1,10	2,35	1,36	2,46	-1,82	1,06
6	26-NO DM2/TBPA	P36	6,83	-12,02	-3,19	-2,27	-1,78	-1,15	-1,71	1,22	-2,42	-1,44
7	27-NO DM2/TBPA	P53	1,87	-2,60	-1,10	1,35	1,71	1,92	2,11	1,57	-1,16	1,13
8	28-NO DM2/TBPA	P54	1,64	-14,66	-2,59	-2,46	-1,63	-1,00	1,08	-1,05	-3,94	-1,40
9	29-NO DM2/TBPA	P55	4,83	-3,44	-1,01	2,77	2,37	3,65	1,73	9,11	-1,14	1,35
10	30-NO DM2/TBPA	P56	4,93	2,32	2,14	4,50	4,26	6,40	3,69	14,42	1,17	4,08

* Valor de expresión relativa promedio obtenido en los 10 pacientes del subgrupo NO DM2/CONTROL. Los números en negritas son los valores de expresión relativa de los genes analizados que no corresponden al subgrupo clínico al cual está ubicado determinado paciente.

En la tabla 15 se muestran los valores de expresión relativa obtenidos en los 10 genes analizados por RT-PCR en tiempo real e identificados por microarreglos, de los individuos de los subgrupos clínico DM2/TBLT (sombreado) y NO DM2/TBPA, en relación al subgrupo de individuos DM2/CONTROL. Se incluye la clave del paciente, así como el número de registro en los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Se señala con negritas los valores que no corresponden al subgrupo respectivo. En la tabla se incluyen los valores de expresión relativa obtenidos de las tres muestras provenientes de los dos pacientes con patrón sugerente de progresión a TBPA (Registros qRT-PCR: P61, P62 y P63).

Tabla 15. Expresión relativa de 10 genes identificados por microarreglos en el grupo de paciente DM2 determinada por RT-PCR en tiempo real.

No.	Gen		HP	IL1-RN	TACC3	NINJ1	IL8-RA	CCR1	ITGB2	IRF1	CD14	PSMB8
	Subgrupo DM2/CONTROL*		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Clave	Registro qRT-PCR										
1	41-DM2/TBLT	P12	1,62	1,62	1,11	-1,57	-1,54	-1,00	-1,04	-1,50	-1,07	1,11
2	42-DM2/TBLT	P10	-5,53	3,67	-1,87	-1,70	1,07	1,14	-1,28	2,72	-2,89	1,03
3	43-DM2/TBLT	P08	3,07	28,37	2,67	4,12	6,73	3,73	3,58	1,89	4,53	2,48
4	44-DM2/TBLT	P11	-1,60	4,63	-1,03	-1,44	-1,18	-1,56	-1,20	-2,14	1,10	-1,11
5	45-DM2/TBLT	P07	1,06	8,79	1,60	-1,11	1,73	1,33	1,19	-1,49	1,21	1,92
6	46-DM2/TBLT	P09	1,12	10,29	1,72	1,63	2,26	2,14	2,93	8,76	2,70	3,73
7	47-DM2/TBLT	P37	1,26	-5,98	2,03	2,47	3,92	2,18	1,95	5,16	-1,10	2,14
8	48-DM2/TBLT	P38	1,66	-9,59	-1,42	1,23	-1,06	2,40	-1,14	1,75	-1,14	-1,54
9	49-DM2/TBLT	P39	-1,45	-5,28	-1,34	1,26	-1,04	1,01	1,06	3,79	-1,13	1,18
10	50-DM2/TBLT	P40	4,50	-3,34	1,35	3,48	3,57	4,66	1,83	5,41	1,74	2,38
1	51-DM2/TBPA	P19	8,62	7,30	-1,02	1,75	1,07	4,07	2,94	2,46	1,36	2,30
2	52-DM2/TBPA	P20	2,60	9,33	2,36	8,24	11,04	18,49	4,61	2,95	6,63	3,98
3	53-DM2/TBPA	P21	17,26	4,73	3,94	2,72	5,16	7,95	6,68	4,72	11,51	3,89
4	54-DM2/TBPA	P22	3,84	-1,10	3,64	2,81	1,45	9,09	5,04	1,85	3,04	2,05
5	55-DM2/TBPA	P23	6,79	16,79	3,84	5,52	9,97	13,94	8,18	3,09	5,72	3,70
6	56-DM2/TBPA	P24	2,54	5,33	1,27	2,86	4,06	2,35	3,18	1,30	2,22	1,58
7	57-DM2/TBPA	P58	5,68	3,45	2,15	3,45	6,38	4,92	4,85	7,75	3,85	3,84
8	58-DM2/TBPA	P59	14,18	4,99	5,72	13,54	12,86	11,92	9,29	53,36	16,59	10,23
9	59-DM2/TBPA	P60	313,57	67,80	59,29	137,70	90,99	161,83	104,16	425,89	159,27	97,37
10	60-DM2/TBPA	P57	11,44	3,64	4,17	4,43	8,82	5,62	8,32	13,13	7,47	5,21
1	DM2/TBLT ¿EN PROGRESIÓN?	P61	49,73	17,71	22,26	20,14	43,04	26,88	24,02	65,54	32,72	27,39
2	DM2/TBLT ¿EN PROGRESIÓN?	P62	28,69	1,34	7,29	11,23	21,18	30,87	8,85	38,88	15,23	9,93
3	DM2/TBPA POST-TX ANTIFÍMICOS	P63	12,58	-2,37	7,46	22,14	15,75	18,15	7,53	52,02	17,01	10,14

* Valor de expresión relativa promedio obtenido en los 10 pacientes del subgrupo DM2/CONTROL. Los números en negritas son los valores de expresión relativa de los genes analizados que no corresponden al subgrupo clínico al cual está ubicado determinado paciente.

Al analizar los datos de los valores de expresión relativa obtenidos por RT-PCR en tiempo real en los pacientes que en el estudio de microarreglos formaron un subgrupo entre los grupos TBLT y TBPA de los pacientes con DM2 (figura 12), se observó, por un lado, que dicha formación se debió principalmente al paciente 43-DM2/TBLT (P8) del cual se tenía ya la sospecha de encontrarse en un estado de progresión de la TBLT a TBPA, ya que los valores encontrados fueron claramente pertenecientes al grupo de TBPA y no al del grupo de TBLT (tabla 15); el otro individuo que contribuyó en la formación del subgrupo fue el paciente 51-

DM2/TBPA (P19) debido posiblemente a aspectos tanto técnicos como biológicos (experimentos 13 y 14 de la figura 12 y tabla 15). Por otro lado, se pudo determinar que aparentemente el tratamiento antifímico administrado por un mes de tiempo no afectó su perfil transcripcional del tercer de los pacientes que también integró este subgrupo (53-DM2/TBPA; P21), ya que los niveles de expresión de los 10 genes estudiados fueron claramente relacionados con su subgrupo clínico DM2/TBPA.

VI. 16. Determinación del poder discriminante, entre pacientes con TBLT y TBPA en individuos con y sin DM2, de los genes identificados por microarreglos y analizados por RT-PCR en tiempo real.

VI.16.1. Cálculo de la sensibilidad y especificidad y de la significancia estadística de los 10 genes analizados. Para el cálculo de sensibilidad y especificidad de cada uno de los genes, en el programa Epidat 3.1 se consideraron tanto los valores de expresión que sí corresponden a determinado grupo de pacientes (verdaderos negativos o verdaderos positivos), como a aquellos que no lo son; esto es, que pertenecen al otro grupo de pacientes analizados (falsos negativos o falsos positivos). Es decir, se consideró un valor de corte de $<2,0$ para los pacientes del subgrupo DM/TBLT y de ≥ 2.0 para los pacientes del subgrupo DM2/TBPA en cuanto al nivel de expresión relativa de cada gene por paciente. Por otro lado, en la prueba de Mann-Whitney no se consideran estos valores de corte para el cálculo de la significancia estadística ($P < 0.05$) ya que compara rango de valores entre grupos; el valor P indica el grado de discriminación que determinado gen presenta para poder distinguir entre el grupo de pacientes TBLT del grupo de pacientes TBPA.

La sensibilidad del gene HP fue del 100 % debido a que los 10 pacientes que conforman el subgrupo DM2/TBPA presentaron valores de expresión relativa de más de 2.0 y corresponden al subgrupo DM2/TBPA. La sensibilidad se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como positivo respecto a la condición que estudia la prueba (en nuestro caso la TBPA); equivale a la fracción de verdaderos positivos. En cuanto a la especificidad, ésta fue del 80%. En este caso dos pacientes DM2/TBLT presentaron valores en expresión relativa de más de 2.0 con perfil DM2/TBPA y DM2/TBLT. La especificidad se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo respecto a la condición que estudia la prueba (en nuestro caso a TBLT); equivale a la fracción de verdaderos negativos. En cuanto a la significancia estadística calculada por la prueba de Mann-Whitney, este gene presenta un valor de P de 0.0002, es decir, que presenta un alto poder de diferenciación entre los dos subgrupos clínicos comparados.

Tabla 16. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del gen HP en los 10 pacientes DM2/TBLT y los 10 pacientes DM2/TBPA.

		Patología		Total pacientes
		TBPA	TBLT	
Resultado de la prueba (gen HP)	Prueba positiva* (≥ 2.0)	Verdaderos positivos (VP): 10 pacientes	Falsos positivos (FP): 2 pacientes	12
	Prueba negativa* (< 2.0)	Falsos negativos (FN): 0 pacientes	Verdaderos negativos (VN): 8 pacientes	8
		VP+FN	VN+FP	
	Total	10 pacientes	10 pacientes	20
Sensibilidad	= $VP/(VP + FN) = FVP$ (fracción de verdaderos positivos): 100%			
Especificidad	= $VN/(VN + FP) = FVN$ (fracción de verdaderos negativos): 83%			

*Valor de expresión relativa del gen por paciente obtenida por RT-PCR en tiempo real.

VI.16.2. Identificación de los mejores genes discriminantes entre pacientes TBLT y TBPA en los grupos de pacientes NO DM2 y DM2.

En relación al grupo de pacientes NO DM2, la sensibilidad y especificidad de los genes para diferenciar a individuos de los subgrupos clínicos NO DM2/TBLT y NO DM2/TBPA en el grupo de "training set" compuesto por 6 pacientes por subgrupo fue del 0% para los genes IL1RN, TACC3 y CD14, mientras que el gene IRF1 fue el único que presentó valores importantes en relación a los demás genes (83 % en ambos parámetros). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico de los datos de expresión en los dos subgrupos clínicos con la prueba de Mann-Whitney, ninguno de los 10 genes analizados presentó valores con significancia estadística ($P < 0.05$). En cuanto al análisis realizado en conjunto a los 10 individuos de cada uno de los dos subgrupo clínico NO DM2/TBLT y NO DM2/TBPA, tanto del grupo del "training set" (6 individuos) como del grupo "test set" (4 individuos), los resultados fueron similares al obtenido con el grupo de "training set" en forma individual. Es decir, el único gene que presentó valor con significancia estadística ($P < 0.05$) fue el gene CD14; sin embargo todos los demás genes, incluyendo este, presentaron valores de sensibilidad y especificidad muy bajos (el gen que presentó valores más altos en ambos parámetros fue el HP con 50% y 70 % respectivamente). Con base en el análisis realizado se puede concluir que ninguno de los 10 genes

analizados es capaz de diferenciar pacientes TBLT y TBPA en el grupo de individuos NO DM2; por consiguiente, dichos genes no pueden ser usados como marcadores de progresión a TBPA en este grupo de pacientes.

En cuanto al grupo de pacientes DM2, en los ensayos de RT-PCR en tiempo real de los 10 genes discriminantes analizados e identificados por microarreglos en el grupo de "training set" (6 pacientes por subgrupo clínico), 5 de ellos (HP, NINJ1, CCR1, ITGB2 y CD14) presentaron valores altos de sensibilidad y especificidad y con valores de $P < 0.05$, en cuanto al poder discriminante entre individuos de los subgrupos clínicos DM2/TBLT y DM2/TBPA, validando los resultados obtenidos inicialmente por microarreglos. Cuando se analizó en conjunto a los 10 individuos de los dos subgrupo clínico DM2/TBLT y DM2/TBPA, tanto del grupo del "training set" (6 individuos) como del grupo "test set" (4 individuos), los resultados fueron similares al obtenido al del grupo de "training set" en forma individual, pero definiéndose a los genes HP, ITGB2 y CD14 como los mejores clasificadores de grupo, con una sensibilidad y especificidad del 100% y 80% respectivamente para los dos primeros genes, y del 90% y 80% para el tercero de ellos; los tres genes presentaron valores de $P < 0.05$ en la prueba de Mann-Whitney, lo cual indica que las medianas entre los dos subgrupos clínicos son significativamente diferentes. Es decir, se encontró que sólo 3 (HP, ITGB2 y CD14) de los 10 genes son suficientes para discriminar y agrupar correctamente a casi todos los individuos a su respectivo subgrupo clínico (DM2/TBLT o DM2/TBPA) (Figura 12). En la tabla 17 se indican la concordancia estadística entre los resultados obtenidos en microarreglos y en RT-PCR en tiempo real, en cuanto a los genes sobreexpresados en el subgrupo de pacientes DM2/TBPA, en relación con el subgrupo DM2/TBLT (específicamente de los 3 genes con más alto poder discriminante), validando nuevamente los resultados por microarreglos.

Tabla 17. Concordancia estadística entre los estudios de microarreglos y RT-PCR en tiempo real de los 3 genes identificados con mayor poder discriminante entre los subgrupos DM2/TBLT y DM2/TBPA.

Ensayo	Microarreglos		RT-PCR en tiempo real			
Programa estadístico	SAM		EPIDAT		GRAPHPAD	
Gen	Nivel de cambio en expresión	Valor q	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor p	Nivel de significancia estadística
HP	26	0	100	80	0.0002	***
ITGB2	8	0	100	80	0.0001	***
CD14	26	0	90	80	0.0005	***

$q= 0-1$; $p<0.05$: genes con alta significancia estadística.

Con base en los valores de expresión relativa obtenidos en los 10 individuos por subgrupo clínico, la prueba estadística de Mann-Whitney asignó correctamente a los 10 individuos con DM2/TBPA con los genes HP e ITGB2 y a 9 individuos con el gen CD14. Por otro lado, la prueba estadística asignó a los diez individuos en el subgrupo correspondiente a DM2/TBLT exceptuando a dos de ellos, ubicándolos en el grupo de pacientes con TBPA (figura 12).

Uno de los dos individuos mencionados corresponde al paciente 43-DM2/TBLT (P8) de quien ya se tenía el antecedente de haberse ubicado en un subclúster localizado entre los grupos de pacientes DM2/TBLT y DM2/TBPA en los estudios de microarreglos (experimentos 3 y 4 del dendrograma respectivo de la figura 12), y del cual ya se tenía la sospecha de encontrarse en ese momento en una fase “inicial” de progresión de TBLT a TBPA. En los estudios de RT-PCR en tiempo real este paciente presenta 9 de 10 genes con valores de >2.0 en expresión relativa el cual corresponde al subgrupo DM2/TBPA, incluyendo a los 3 genes identificados

como los mejores clasificadores de grupo, es decir HP, ITGB2 y CD14 (tabla 15 y figura 12). Esta sospecha se apoya con datos clínicos adicionales.

El otro individuo que la prueba estadística de Mann-Whitney ubicó en el subgrupo DM2/TBPA en lugar del DM2/TBLT es el paciente 46-DM2/TBLT (P09) ya que los niveles de expresión relativa de 7 de 10 genes incluyendo a 2 de los 3 genes candidato de progresión presentaron valores de >2.0 , lo cual sugiere que posiblemente este paciente también se encuentre en una fase inicial de progresión a TBPA.

El análisis estadístico realizado a los datos de expresión relativa obtenidos en los pacientes de los subgrupos NO DM2/TBLT y NO DM2/TBPA, indica que ninguno de los 10 genes analizados fue capaz de discriminar entre pacientes de estos dos subgrupos clínicos. Sin embargo, en el grupo de pacientes DM2, sí fue posible identificar genes con alto poder de discriminación entre individuos TBLT y TBPA, siendo estos HP, ITGB2 y CD14. Por lo tanto, estos genes discriminantes podrían ser usados para identificar pacientes DM2 que estuviesen en un estado de progresión de TBLT a TBPA (figura 13).

El gen HP pertenece al grupo de genes inflamatorios, mientras que los genes ITGB2 y CD14 pertenecen al grupo de genes homólogos de humano identificado en el modelo de ratón involucrado en la progresión de la TBPA, ambos grupos de genes incluidos en el diseño del microarreglo CustomArray 4X2K de CombiMatrix utilizado en el estudio.

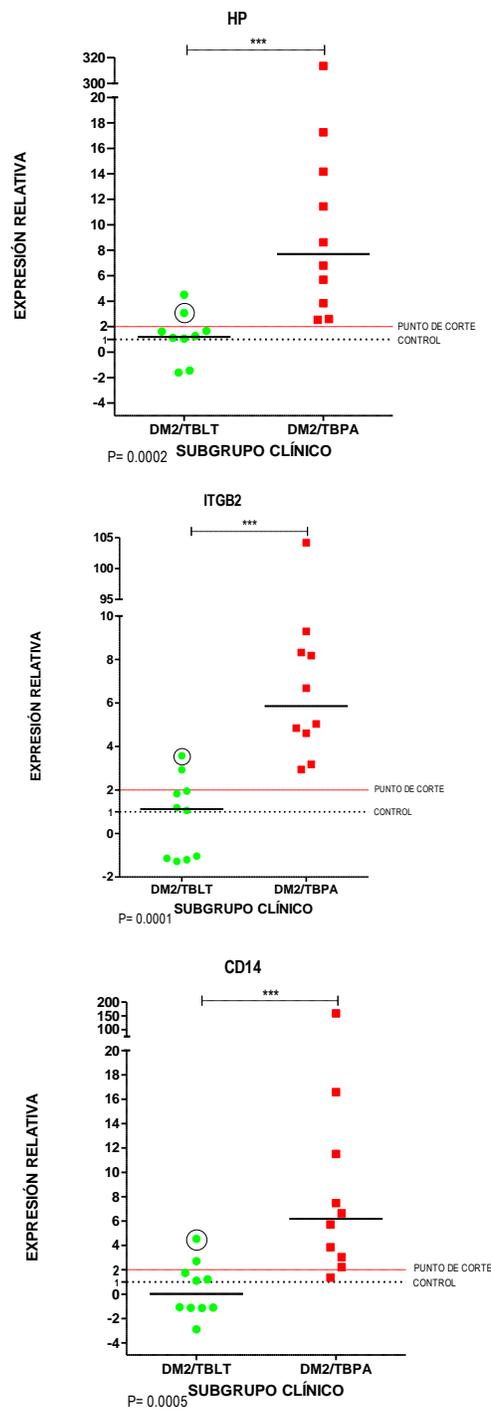


Figura 13. Distribución de pacientes de los subgrupos clínicos DM2/TBLT y DM2/TBPA observada en los 3 genes con más alto poder discriminante, basada en los niveles de expresión relativa obtenidos por RT-PCR tiempo real. Con un círculo se indica al paciente P8 en estado sugestivo de progresión a TBPA y con línea punteada el valor de expresión relativa del subgrupo de pacientes DM2/CONTROL; se señala, además, el punto de corte en cuanto al nivel de expresión entre ambos subgrupos clínicos. El valor P fue calculado mediante la prueba estadística de Mann-Whitney. La barra representa la mediana.

VI.16.3. Utilización de los genes HP, ITGB2 y CD14 como marcadores de progresión de TBLT a TBPA en pacientes con DM2. A continuación se señalan dos casos clínicos importantes de progresión a TBPA, uno presuntivo y el otro confirmado, que sugieren que los 3 genes discriminantes entre pacientes DM2/TBLT y DM2/TBPA identificados, son capaces de detectar a pacientes DM2 en fase de progresión de la infección latente a la infección pulmonar activa. Es decir, que dichos genes podrían ser usados como genes predictores de progresión de TBLT a TBPA en este grupo de pacientes inmunocomprometidos. Estos genes podrían ser nombrados como “HP, ITGB2 y CD14: genes candidato de progresión de tuberculosis latente a tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2”.

VI.16.4. Identificación de un caso clínico probable de progresión de TBLT a TBPA en un paciente con DM2. Considerando los valores de expresión obtenidos por RT-PCR en tiempo real de los 10 genes estudiados en la paciente 43-DM2/TBLT (P8), de quien se tenía ya el antecedente de haberse ubicado en un subclúster localizado entre los grupos de pacientes DM2/TBLT y DM2/TBPA en los estudios de microarreglos (experimentos 3 y 4 del dendrograma respectivo de la figura 12). En la tabla 15 se puede observar que este paciente presenta, efectivamente, los niveles de expresión correspondiente no al del subgrupo DM2/TBLT sino al del subgrupo DM2/TBPA con valores de expresión relativa de >2.0 en 9 de los 10 genes, incluyendo en los 3 genes candidato de progresión identificados: 3.07, 3.58 y 4.3 respectivamente (M1 de la figura 14). Esta sospecha se reforzó con los resultados obtenidos en una segunda muestra sanguínea tomada al paciente 2 años y 2 meses después de la primera toma (P61 de la tabla 15 y M2 de la figura 14), en donde se puede apreciar de que no sólo presentó un perfil similar al del subgrupo DM2/TBPA sino que, en forma por más interesante, los valores de expresión de los 10 genes analizados incluyendo a los tres genes candidato de progresión, son mucho más elevados que en la mayoría de los demás pacientes de dicho subgrupo con TBPA. Los resultados obtenidos en esta fase de la infección de la paciente nos permitieron conocer el posible perfil transcripcional característico de la TBLT en progresión, la cual sería similar al del subgrupo DM2/TBPA, pero con la peculiaridad de que en la mayoría de los genes analizados, incluyendo a los 3 genes candidato de progresión, el nivel de expresión es mucho mayor para estos 3 genes en relación al promedio de la expresión de dicho subgrupo con TBPA; el incremento fue de 6.1 veces más en el gen HP, de 4.4 veces más en el gen CD14 y en el caso del gen ITGB2 el incremento fue de 4.6 veces más, para la segunda muestra sanguínea tomada al paciente que se obtuvo en esta fase de progresión de la TBLT (en el cálculo del promedio de expresión del subgrupo DM2/TBPA no se incluyó al paciente 59-DM2/TBPA (P60) ya que representa un caso extraordinario en cuanto a los niveles de expresión relativa de los tres genes estudiados: 313.5, 104.1 y 159.2 respectivamente; la diferencia de este paciente en relación al promedio de expresión de

los demás pacientes del subgrupo DM2/TBPA fue de 39, 19 y 22 veces más en HP, ITGB2 y CD14 respectivamente). En relación con el promedio de la expresión relativa del subgrupo DM2/TBLT, el incremento observado en los 3 genes fue de alrededor de 49 y 24 y 32 veces más respectivamente (figura 14). En esta segunda visita, el paciente presentó ya una imagen anormal de tórax en las placas de rayos X en comparación con la primera, sugiriendo una fase “avanzada” de progresión de la TBLT.

Es muy importante hacer notar que con los tres genes discriminantes identificados (HP, ITGB2 y CD14) sería posible identificar al medir el nivel de expresión de estos genes en pacientes con DM2/TBLT que se encuentren en fase de progresión hacia la tuberculosis activa, aún sin que presenten sintomatología clínica sugestiva a TBPA, e inclusive sin que presenten ninguna imagen anormal a nivel torácico en la placa de rayos X. En las tres gráficas de la figura 13 se señala con un círculo a la paciente mencionada anteriormente [43-DM2/TBLT (P8)] correspondiente a la primera muestra sanguínea tomada, en donde se puede observar que se encuentra dentro del grupo de pacientes con TBPA.

Otro dato que apoya la posibilidad de que el paciente se encuentra en un estado de progresión, es que el patrón de expresión de los 3 genes candidato de progresión son similares en su comportamiento con el patrón de expresión identificado con otro paciente DM2 con TBLT en progresión a tuberculosis activa (P62 de la tabla 15), ya que 14 meses después desarrolló la TBPA (P23 de la misma tabla). Este último paciente representa un caso claro y confirmado de TBLT en progresión a TBPA con valores de expresión similares [43-DM2/TBLT (P8 y P61) de la tabla 15] también se encuentra, muy posiblemente, en una fase de progresión hacia la infección activa.

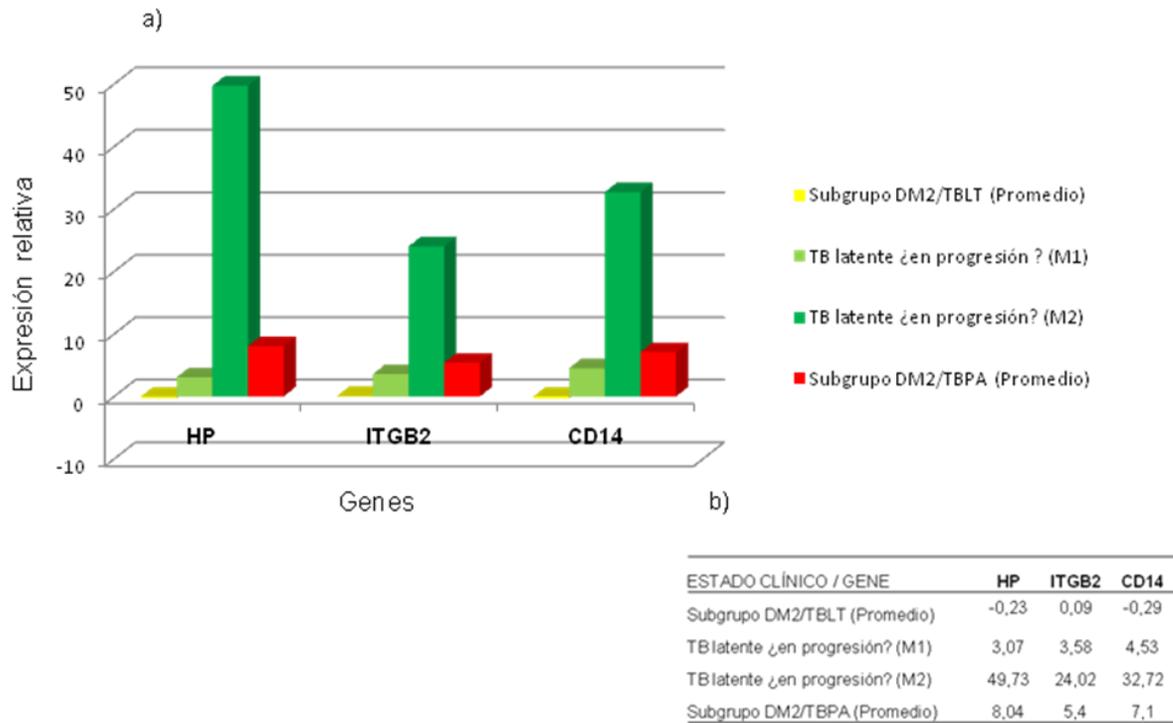


Figura 14. Comportamiento de los 3 genes candidato de progresión a TBPA en un paciente con DM2/TBLT en estado sugerente de progresión a TBPA. Se muestra un caso clínico sugerente de progresión de TBLT a TBPA en un paciente con DM2. a) Gráfica en donde se muestran los niveles de expresión relativa obtenidas por RT-PCR en tiempo real de la paciente en fase de tuberculosis latente en progresión; se incluyen los valores promedio de expresión, tanto del subgrupo DM2/TBLT como del subgrupo DM2/TBPA para fines de comparación. b) Tabla en donde se indican los valores de expresión relativa obtenidas en los 3 genes candidato de progresión en los diferentes estados clínicos de la TB analizados.

VI.16.5. Identificación de un caso clínico confirmado de progresión de TBLT a TBPA en un paciente con DM2. Este paciente se logró identificar como un caso de progresión debido a que cuando se reclutó como caso de TBPA para realizar los estudios de microarreglos, nos percatamos de que meses antes del diagnóstico este mismo paciente ya se había detectado como posible candidato para integrar el subgrupo de pacientes DM2/TBLT. El paciente no se integró al estudio ya que a pesar de que reunía todos los criterios de selección establecidos para dicho subgrupo clínico, el reporte del análisis de la placa de rayos X de tórax que se dio por parte del neumólogo, indicó que había una imagen anormal compatible con TBPA. A continuación se describe el caso clínico, tanto en la fase latente en progresión, como en la fase activa de la infección y después del tratamiento con antifímicos (figura 15):

VI.16.5.i. Paciente en la fase latente de la infección en progresión hacia la fase activa. Paciente femenino de 60 años de edad con DM2 no bien controlada y con un tiempo de evolución de 15 años. En julio del 2006 reunía todos los criterios para integrar el subgrupo clínico DM2/TBLT (210 mg/dl de glucosa sanguínea, HbA1c 6.82%, sin sintomatología para TBPA, COMBE: negativo, PPD: positivo (15 mm), QFT-Gold: positivo, BAAR y cultivo para MTB: negativos), excepto por tener una imagen anormal sugestiva a TBPA en la placa de rayos X de tórax, razón por lo cual no se integró al estudio de microarreglos; las muestras sanguíneas tomadas en tubos PAXgene se conservaron a -80°C para una posible utilización posterior. Este paciente desarrolló posteriormente la infección activa. Las muestras sanguíneas tomadas en este intervalo se aprovecharon para realizar los ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando los genes identificados por microarreglos (P62 de la tabla 15).

Los resultados obtenidos en esta fase de la infección de la paciente nos permitieron conocer el perfil transcripcional del paciente que resultó ser característico de la TBLT en progresión, similar al del subgrupo DM2/TBPA, pero con la peculiaridad de que en la mayoría de los genes analizados, el nivel de expresión está muy por arriba de incluso los perfiles de pacientes con TBPA. El incremento de la expresión de dos de los tres genes candidato de progresión identificados, en relación a la fase activa de la infección de la misma paciente, fue de 4.2 veces más para el gene HP y de casi 3 veces más para el gene CD14 en esta fase de progresión; en el caso del gene ITGB2 no se observó un incremento significativo tal como en el caso clínico probable de progresión anteriormente expuesto. Para el cálculo del promedio de expresión del subgrupo DM2/TBPA no se incluyó tampoco al paciente 59-DM2/TBPA (P60), ya que representa un caso diferente por los altos niveles de expresión obtenidos en los genes estudiados). En relación con el promedio de la expresión relativa del subgrupo DM2/TBLT, el incremento observado en dicha paciente en la fase latente de

la infección en estado de progresión, fue de alrededor de 29, 9 y 15 veces más en HP, ITGB2 y CD14 respectivamente (figura 15).

VI.16.5.ii. Paciente en la fase activa de la infección. En noviembre del 2007, es decir 1 año 4 meses después de la primera toma sanguínea en la que presuntamente la paciente desarrolló la infección activa, este presentó toda la sintomatología característica de la TBPA (tos, fiebre y sudoraciones nocturnas por más de 15 días) presentando una imagen en la placa de rayos X de tórax anormal sugestiva a TBPA. En este caso se confirmó el diagnóstico con un resultado de BAAR positivo a partir de una muestra de aspirado bronqueo alveolar debido a la incapacidad de la paciente para expectorar, integrándose al subgrupo clínico DM2/TBPA para el estudio de microarreglos (55-DM2/TBPA). El perfil transcripcional obtenido correspondió perfectamente al del subgrupo DM2/TBPA, tanto en los resultados de microarreglos (experimentos 21 y 22 de la figura 12), como en los de RT-PCR en tiempo real (P23 de la tabla 15; ver también la figura 15).

VI.16.5.iii. Paciente en la fase de post-tratamiento con antifímicos. En julio del 2008, después del tratamiento antifímico TAES (Fase intensiva de 2 meses y medio: HRZE; fase de sostén de 5 meses: HR), y una vez que la paciente fue de alta por su médico tratante se tomó una muestra de sangre adicional con el propósito de realizar ensayos de RT-PCR en tiempo real para determinar su perfil transcripcional en estas condiciones (P63 de la tabla 15). Los resultados obtenidos sugirieron que la paciente posiblemente se encontraba en un estado de la infección aún no resuelta, o que tal vez se encontraba en un estado de recurrencia de la infección, ya que la expresión obtenidos en la mayoría de los genes analizados (incluyendo a dos de los 3 genes candidato de progresión) presentaron niveles más elevados, inclusive de cuando se encontraba en la fase activa de la infección. Con base en estos resultados se sometió a la paciente a una revisión médica y se le tomó una placa de rayos X de tórax; en esta ocasión la paciente aparentemente se encontraba en buenas condiciones de salud y el reporte de la placa de rayos X de tórax fue anormal no sugestiva a TBPA.

Sin embargo, en febrero del 2009, es decir, aproximadamente siete meses después de la última visita se realizó una revisión médica a la paciente; en esta ocasión se detectó que presentaba hipoventilación apical derecha y calosfríos recurrentes, razón por la cual se le tomó otra placa de rayos X de tórax. La interpretación hecha por el médico neumólogo en esta ocasión fue anormal compatible con TBPA, es decir, que en el transcurso de siete meses la paciente había presentado señales de una posible recurrencia de la infección (reinfección o reactivación), coincidiendo con los resultados obtenidos en cuanto los niveles de expresión de los genes analizados por RT-PCR en tiempo real de la paciente en esta fase de post-tratamiento. Un dato importante que la paciente refirió, fue el fallecimiento de su hermano mayor ocurrido dos

meses atrás debido muy posiblemente a tuberculosis pulmonar, según el cuadro clínico que presentó al momento de su muerte. En la figura 15 se puede observar que en la fase de postratamiento, los niveles de expresión relativa de los 3 genes candidato de progresión a TBPA no sólo no disminuyeron, sino que inclusive, los genes HP y CD14 aumentaron en forma importante en relación a la fase activa de la infección. Es probable que estos mismos genes pudieran servir como marcadores para evaluar la eficacia del tratamiento con antifímicos.

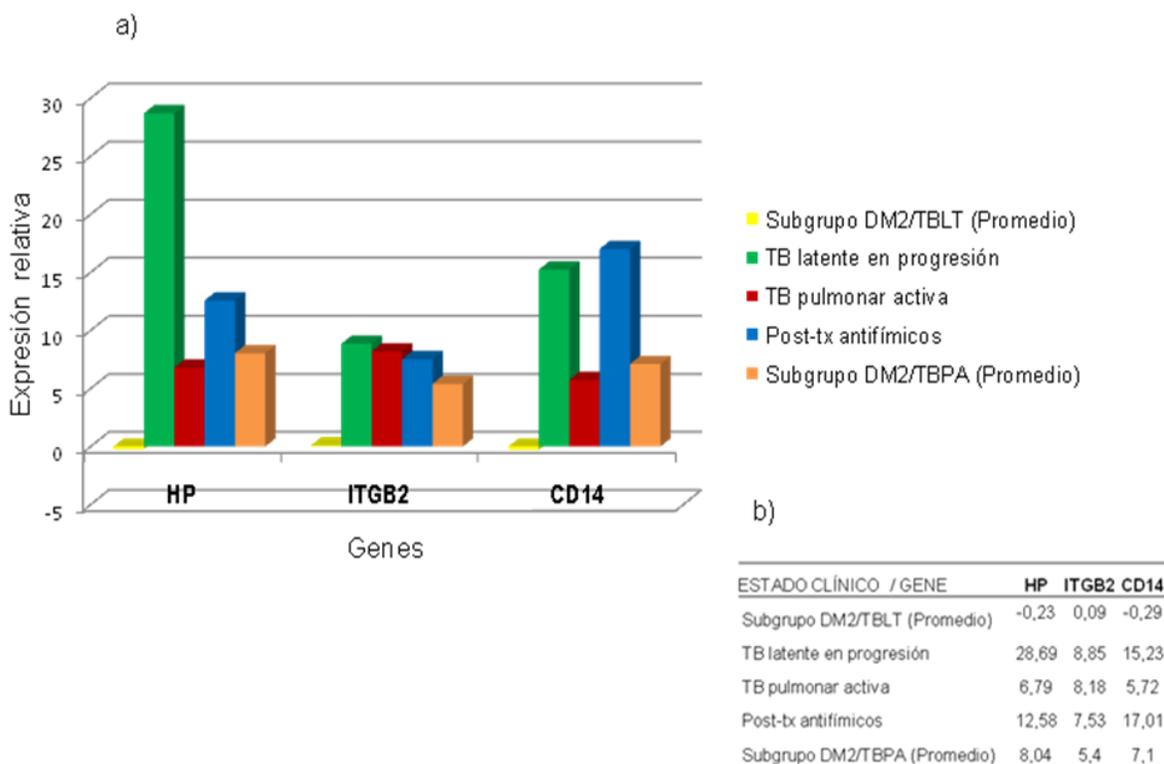


Figura 15. Comportamiento de los 3 genes candidato de progresión a TBPA en un paciente con DM2/TBLT que reactivó a TBPA. Se muestra un caso clínico identificado de progresión de TBLT a TBPA en un paciente con DM2. a) Gráfica en donde se muestra los niveles de expresión relativa obtenidas por RT-PCR en tiempo real de la paciente en la fase latente en progresión, en la fase activa y después del tratamiento con antifímicos; se incluyen los valores promedio de expresión, tanto del subgrupo DM2/TBLT como del subgrupo DM2/TBPA para fines de comparación. b) Tabla en donde se indican los valores de expresión relativa obtenidas en los 3 genes candidato de progresión en los diferentes estados clínicos de la TB analizados.

El caso de este paciente refleja el objetivo del proyecto, ya que nos permitió conocer el perfil transcripcional característico de la fase latente de la infección en estado de progresión en pacientes con DM2, en relación con la TBLT y la TBPA, el cual es similar al del grupo de pacientes con TBPA pero con niveles de expresión más altos.

Tomando en consideración los dos casos mencionados, es importante considerar en futuros estudios la posibilidad de encontrar pacientes DM2/TBLT con niveles de expresión relativa de los 3 genes candidato con valores de más de 2.0, con el propósito de lograr identificar a pacientes con TBLT que se encuentren en un estado de progresión a TBPA, aún sin presentar ninguna sintomatología o dato clínico característico de la enfermedad activa.

VII. DISCUSIÓN

Actualmente no existe ninguna prueba diagnóstica que permita identificar a individuos con tuberculosis latente progresando a tuberculosis pulmonar activa (72) incluyendo a pacientes con factores de riesgo como la diabetes mellitus tipo 2. La detección temprana de individuos en este estado de progresión podría conducir al tratamiento profiláctico dirigido antes de presentar la enfermedad activa, reduciendo de esta forma su transmisión y por consiguiente el grave problema de la tuberculosis a nivel mundial.

La finalidad del presente trabajo fue el de determinar marcadores moleculares de progresión a tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Ya que este trabajo involucró el análisis de perfiles de expresión a escala genómica en un estudio multicéntrico, es decir, a diferentes tiempos y en diferentes lugares, se utilizó una metodología que incluyó protocolos estándar para la toma y procesamiento de las muestras sanguíneas manteniendo la integridad de la huella transcripcional para obtener resultados confiables.

En primer lugar, mediante el uso del sistema PAXgene Blood RNA, se garantizó la obtención de RNA total de alta calidad, con una huella transcripcional intacta en los individuos sujetos de estudio, de tal forma que ésta fuera representativa de la condición fisiopatológica existente en el momento de la toma sanguínea, evitando con ello la detección errónea de genes sensibles a la manipulación ex-vivo de las células sanguíneas. Se han reportado, debido esta causa, genes sobreexpresados asociados a hipoxia, así como genes regulados negativamente asociados con el metabolismo (73) y genes relacionados en procesos celulares básicos, tales como en la regulación transcripcional, en la progresión del ciclo celular y la apoptosis, así como genes que codifican proteínas que realizan funciones esenciales en la respuesta inmune (74) los cuales pueden ser importantes en los estudios transcripcionales a gran escala como en el caso del presente estudio. El sistema PAXgene Blood RNA ha sido empleado con buenos resultados en la detección temprana de cáncer de seno en pacientes asintomáticas, basada en perfiles de expresión por microarreglos por Sharma y colaboradores en el 2005 (52).

En segundo lugar, se usó un método simple y altamente estandarizado para la reducción de transcritos de globina del RNA total, que pudiera discriminar diferencias de expresión muy pequeñas entre dos clases de condiciones fisiopatológicas (66), así como un procedimiento de amplificación de transcritos que permitiera incrementar la sensibilidad de los ensayos de expresión detectando más cantidad de genes diferencialmente expresados (75). Además, se empleó una novedosa plataforma de microarreglos costo-efectivo, un biochip

electrónico basado en la síntesis electroquímica *in situ* de las sondas de oligonucleótidos, lo cual permitió el análisis de varias muestras a la vez a un costo razonable, utilizando tan sólo 1 µg de muestra de cRNA biotinilada por arreglo (62). Una metodología similar ha sido utilizada por Devey y colaboradores en el 2006 en donde se demuestra que esta estrategia permite identificar un número de genes importantes (66), comparable con la metodología que se usa actualmente al utilizar células mononucleares de sangre periférica (72); aunque desafortunadamente, esta última metodología sólo es posible usarla en estudios clínicos multicéntricos, cuando las células mononucleares son aisladas inmediatamente después de la toma sanguínea directamente en los diferentes sitio clínicos, lo cual demanda un esfuerzo organizacional muy importante (76). Como se demuestra en nuestro trabajo y en el reportado por Devey y colaboradores, el uso de esta metodología permitió identificar predictores de clase en un amplio rango de expresión aún para clases con muy pequeñas diferencias en expresión genética, tal como diferencias de expresión asociadas al género de los individuos. En nuestro caso se identificaron predictores de clase entre pacientes con TBLT y TBPA.

El reclutamiento de los individuos que integraron el estudio se realizó bajo estrictos criterios de selección, tanto clínico como de laboratorio; es decir, que se aseguró que los integrantes de los diferentes subgrupos clínicos reunieran los criterios preestablecidos para dicho subgrupo (figura 2). El grupo encabezado por Stefan Kauffman en el 2006 identificó un grupo de genes que permiten discriminar entre individuos con tuberculosis latente y pacientes con la infección activa. Los criterios que usaron para la selección de los individuos fue, para la infección latente: prueba de PPD >10 mm y COMBE positivos; para los donadores sanos o grupo control el criterio fue el de no tener historial clínico de TB, mientras que para el grupo con TB activa fue un diagnóstico clínico basado en la radiografía de tórax y por la confirmación por el laboratorio, en cuanto el cultivo de la micobacteria. En este estudio no se usó ningún método para congelar la huella transcripcional al momento de la toma sanguínea. En el grupo de genes discriminantes identificados por este grupo se encuentra: la alfa defensina 1, la alfa defensina 4, la lactoferrina, el CD64 y la proteína incrementadora de la permeabilidad bacteriana, así como el receptor 1 péptido formil (77). En nuestro caso, en los ensayos de microarreglos realizado a este mismo grupo de pacientes sin DM2, nosotros identificamos que el perfil transcripcional del conjunto de genes incluidos en el chip, perfectamente clasifica o discrimina a los individuos del grupo con tuberculosis latente de los individuos del grupo con la enfermedad activa, ya que cada uno de ellos forma un clúster por separado tal como se muestra en la figura 11. En el grupo de genes que se sobreexpresaron en este subgrupo clínico, encontramos que el único gen común a los identificados por Kauffman y colaboradores, fue la alfa defensina 1, un péptido antimicrobiano producido por los neutrófilos que al ser transferido al macrófago en la apoptosis se establece una estrategia de defensa sinérgica en contra de

microorganismos intracelulares como *M. tuberculosis* (78). Es posible que la diferencia en los genes identificados por ambos grupos sea debida, entre otros factores, a los criterios de selección de los individuos y al método de toma y conservación de la muestra sanguínea que se usó en ambos estudios, según a lo planteado previamente.

En el presente estudio se identificó un grupo de genes candidato a partir de sangre periférica completa que pueden servir como marcadores moleculares de progresión de tuberculosis latente a tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Al utilizar los datos obtenidos en los ensayos de microarreglos de expresión y de RT-PCR en tiempo real y al realizar un análisis discriminante, se reveló que HP, ITGB2 y CD14 representan un grupo de genes óptimos para clasificar individuos con tuberculosis latente y tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2; estos genes candidato se sometieron a un proceso de validaron en un segundo grupo de pacientes.

Con el uso de los genes HP, ITGB2 y CD14 logramos identificar un perfil transcripcional característico de la tuberculosis latente en progresión, en un paciente con diabetes mellitus tipo 2 que posteriormente reactivó a tuberculosis pulmonar activa; este individuo se logró detectar en una fase temprana del desarrollo de la infección activa aún sin que presentara ninguna sintomatología clínica de la enfermedad. Dicho paciente representa un caso confirmado de reactivación de la infección latente por *M. tuberculosis*. De igual manera, este perfil transcripcional se identificó en otro paciente con tuberculosis latente en un estado sugerente de progresión a enfermedad activa, el cual, hasta el momento no ha presentado sintomatología clínica relacionada con la infección activa, pero que sin embargo presenta ya una imagen de tórax anormal en la placa de rayos-X; esta paciente, a diferencia de la paciente anterior, lleva un buen control de la diabetes factor importante para mantener la latencia de la infección. Ministry y colaboradores en el 2007 detectaron que un individuo inicialmente clasificado clínicamente con tuberculosis latente, pudo haberse encontrado en ese momento progresando a la enfermedad activa, ya que al realizar una función discriminante utilizando los datos de expresión obtenidos por RT-PCR en tiempo real éste fue asignado al grupo de pacientes con la enfermedad activa y no al grupo con la infección latente. Al revisar posteriormente el caso, se identificó que este individuo había desarrollado la enfermedad pulmonar activa tiempo después de su reclutamiento al estudio (61). Esta observación, junto con las evidencias que se han expuesto en nuestro trabajo, sobre el caso confirmado y el caso sugerente de progresión, apoyaría la posibilidad de que este último también se encuentre realmente en un estado de progresión de TBLT a TBPA.

Los datos de nuestro estudio permitieron identificar por lo menos dos fases de progresión de la tuberculosis latente, con base en los niveles de expresión relativa de los genes predictores de progresión

identificados en este trabajo: a) Primera fase o etapa temprana de progresión, cuando en un paciente con DM2/TBLT, sin sintomatología y sin una imagen radiográfica de tórax sugerente a TBPA, los valores de expresión de los biomarcadores HP, ITGB2 y CD14 están entre 2.0 y 4.0 (este último valor representa la expresión relativa promedio de los tres genes predictores del caso sugerente de progresión en la primer muestra sanguínea ; b) Segunda fase o etapa avanzada de progresión, cuando un paciente con DM2/TBLT, sin sintomatología y con una imagen anormal sugerente o no a TBPA, sus valores de expresión de biomarcadores son mayores de 4.0. El tiempo en el que la enfermedad activa se presente posterior a la detección de la fase de progresión de la tuberculosis latente, muy posiblemente dependerá de la edad del paciente, de los años de evolución y del control de la diabetes, entre otros factores. En este sentido, Tsukaguchi y colaboradores en 1992 y en el 2002 indican que en pacientes con DM2/TBPA existe una disminución significativa en la producción de TNF- α y de IFN- γ no debido a la infección tuberculosa, sino debido a un mal control de la diabetes (32, 33); estos estudios sugieren una fuerte correlación entre la inmunidad de la tuberculosis y la diabetes mellitus tipo 2, considerando el importante papel que juegan estas dos citocinas en la formación y mantenimiento del granuloma micobacteriano, cuya función principal es la de prevenir la diseminación de la micobacteria (79). Por lo tanto, con base en lo mencionado anteriormente sería importante considerar en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 infectados en forma latente y que se encuentren en un estado sugerente de progresión (DM2/TBLT en progresión), el tratamiento antifímico profiláctico con el fin de prevenir la reactivación y la potencial transmisión de la micobacteria a la población, así como el de evitar complicaciones en este tipo de paciente inmunocomprometidos. Por supuesto, un mayor número de pacientes con DM2/TBLT deberán ser analizadas en un futuro antes que la eficacia clínica de nuestros hallazgos pueda ser evaluada cabalmente.

De los tres genes identificados como candidatos de progresión a tuberculosis pulmonar activa HP, ITGB2 y CD14, los dos últimos pertenecen al grupo de genes relacionados con la progresión a tuberculosis activa a partir de tejido pulmonar en el modelo de ratón identificados previamente por nuestro grupo de investigación, mientras que el gen HP corresponde al grupo de genes relacionados con inflamación; ambos grupos de genes fueron incluidos en el diseño del microarreglo CustomArray 4X2K de CombiMatrix utilizado en el presente trabajo de tesis. La inclusión de otros grupos de genes en el diseño del microarreglo, entre ellos el grupo al que pertenece el HP, incrementó la posibilidad de identificar genes muy importantes no incluidos en el chip MG-U74Av2 de Affymetrix utilizado en el modelo de ratón, ya que, a la fecha, se estima que el genoma del ratón contiene aproximadamente 30,000 genes y este chip interroga solamente para 12,500.

Beamer y colaboradores en el 2008 usando modelos murino con diferentes susceptibilidades a TB encuentra que la respuesta inmune antígeno específica en sangre periférica es un indicador sensible de eventos específicos que suceden en el pulmón, indicando que la sangre puede ser un tejido de prueba apropiado en humanos, sugiriendo que la baja producción de IFN- γ por los linfocitos T de humano y de ratón en respuesta al estímulo de antígenos específicos de *M. tuberculosis*, pudiera ser un marcador de progresión a la TBPA activa (72). Nuestros resultados muestran que existe una correlación entre el perfil transcripcional de los genes ITGB2 y CD14, en relación a la respuesta del huésped hacia *M. tuberculosis*, tanto en el tejido pulmonar del ratón como en sangre completa del humano. De tal forma que estos resultados concuerdan con nuestra hipótesis respecto a que los genes identificados en el modelo de ratón pueden servir como marcadores moleculares en sangre periférica de humanos en progresión a tuberculosis pulmonar activa, antes de presentar síntomas clínicos.

Sin embargo, los tres genes identificados por nosotros como candidatos de progresión a tuberculosis pulmonar activa HP, ITGB2 y CD14 sólo son válidos para el subgrupo de pacientes DM2/TBPA y no para el NO DM2/TBPA, ya que por lo menos con los 10 genes analizados por RT-PCR en tiempo real comunes en ambos subgrupos clínicos, en el segundo no se encontró que estos genes fueran clasificadores de grupo, es decir, que pudieran discriminar entre pacientes con TBLT de pacientes con TBPA. Es conveniente, en trabajos futuros, analizar mediante RT-PCR en tiempo real a otro grupo de genes sobreexpresados en el subgrupo NO DM2/TBPA, con el fin de identificar posibles marcadores de progresión en este grupo particular de pacientes. Con base en un análisis realizado utilizando los datos obtenidos por microarreglos de este grupo de genes, 5 de ellos MMP9, TIMP1, PGLYRP1, TNFAIP2 y PLAUR podrían ser los posibles genes candidato de progresión. En concordancia con lo planteado, se sabe que LAM (lipoarabinomana) y otros componentes de *M. tuberculosis* inducen la expresión de MMP9 en macrófagos de humanos (80) y que en la tuberculosis pleural MMP9 y TIMP1 están sobreexpresados (81). En la figura 11 se muestra la imagen de uno de estos genes, el MMP9, el cual es claramente sobreexpresado en el grupo de pacientes con TBPA (en rojo), mientras que este mismo gene se encuentra regulado negativamente en su expresión en todos los individuos con TBLT (en verde). Por lo tanto, consideramos que el criterio más adecuado para identificar, mediante RT-PCR en tiempo real, a los posibles genes candidatos de progresión en este grupo de pacientes, debe ser basado en la lista de genes sobreexpresados generados por el programa SAM (tabla 10) y correlacionándolos con el análisis de las imágenes obtenidas en el programa "Cluster Tree View" (figura 11), y no bajo el criterio basado solamente en la lista de genes comúnmente sobreexpresados en ambos grupos de pacientes con y sin DM2.

Nuestros datos indican que cuando un paciente con diabetes mellitus tipo 2 se encuentra en un estado de progresión de la tuberculosis latente, los niveles de expresión relativa de los 3 genes candidato de progresión a TBPA se elevan en forma muy significativa en relación a los individuos con infección latente y en forma muy importante en relación a los pacientes con la enfermedad activa.

En los pacientes con perfiles de expresión que sugieren progresión a enfermedad activa, se puede observar cómo los niveles de expresión de los genes se incrementa con el tiempo conforme va evolucionando la progresión de la TBLT, observando que en una etapa temprana este incremento presenta valores similares al valor promedio del encontrado en la fase activa de la infección, mientras que en la etapa avanzada de la progresión, independientemente del tipo de evolución el incremento observado fue mayor que el promedio de los pacientes con la enfermedad activa (6.1 veces en el gene HP, de 4.4 veces en el gene CD14 y en el caso del gene ITGB2 el incremento fue de 4.6 más).

El paciente que representa el caso confirmado de progresión de la infección latente lo logramos reclutar casualmente en el momento que se le hizo el diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar activa, ya que al realizársele los estudios de rutina preoperatorios debido a un problema de rodilla, el médico tratante observó que ésta presentaba síntomas y una imagen de tórax anormal en la placa de rayos X sugerentes a TBPA; el diagnóstico se confirmó mediante una tinción de Ziehl-Neelsen a un aspirado bronqueo alveolar, debido a la incapacidad de la paciente para expectorar; en este sentido, la imposibilidad de contar con una muestra de expectoración o de muestras biológicas adecuadas para realizar el diagnóstico en forma oportuna, se refleja en una inadecuada detección de nuevos casos de TBPA, incrementando así el problema global de la enfermedad (82). Cuando dicha paciente se reclutó para integrar el subgrupo de DM2/TBPA en el presente trabajo de investigación, detectamos que meses antes ya la habíamos estudiado como posible candidato a integrar el subgrupo de DM2/TBLT, ya que reunía todas los criterios de selección, excepto por presentar una imagen anormal de tórax sugestiva a TBPA, pero sin la sintomatología característica de la enfermedad, razón por la cual no se integró al estudio. Al analizar los datos de expresión relativa de 10 genes asociados con progresión a enfermedad tuberculosa, nos percatamos de que dichos valores no sólo no correspondían al grupo de pacientes con TBLT, sino que además, y en forma inesperada, en 9 de los 10 genes analizados estos valores de expresión estaban muy por arriba a los encontrados en la fase activa de la misma paciente; en éstos se incluían los genes HP, ITGB2 y CD14 los cuales posteriormente se identificaron como los mejores predictores de clase al realizar el análisis discriminante. Cuando se realizaron los estudios de RT-PCR en tiempo real se incluyeron, además de la muestra correspondiente al estado de progresión, la muestra correspondiente a la fase activa de la infección tuberculosa y a la correspondiente de la fase de post-

tratamiento con antifímicos de esta misma paciente. En esta última fase, en forma también inesperada, los niveles de expresión de los genes HP y CD14 no sólo no disminuyeron sino que además se incrementaron con respecto a la fase activa; en el gen ITGB2 los niveles de expresión relativa disminuyeron en tan sólo medio punto.

Nuestros resultados sugieren que esta paciente presenta una TBPA aun no resuelta, definida a nivel molecular, como altos niveles de expresión de los genes HP, ITGB2 y CD14; en segundo lugar, considerando el aspecto clínico, la imagen de tórax anormal indicó una posible reactivación, sustentada en los signos y síntomas presentados. El aspecto epidemiológico fue importante para corroborar esto, dado que el paciente tuvo antecedente de haber estado en la fase post-tratamiento en contacto directo con un hermano que recién había fallecido muy probablemente debido a TBPA. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Pacheco y colaboradores en el 2004 en cuanto a que los niveles de una forma soluble del CD14 (sCD14) existente en suero humano se ve incrementada en pacientes con tuberculosis activa, mientras que estos son normales después de un tratamiento antifímico exitoso (83). En el mismo sentido, Juffermans y colaboradores en el 1998 observan que la concentración en suero de esta forma soluble de sCD14 es más baja en pacientes con TBPA bajo tratamiento con antifímicos, comparada con pacientes con tuberculosis recién diagnosticados y que los niveles fueron normales en aquellos que completaron el tratamiento exitosamente (84). Así, la medición de CD14 en la TBPA puede ayudar a monitorear el tratamiento antituberculoso. Se ha reportado que tanto sCD14 como mCD14, la forma asociada a membrana de CD14, juegan un papel muy importante en la respuesta del huésped hacia *M. tuberculosis*, actuando como receptores para LAM conduciendo a la activación de macrófagos (85). Aunque nuestros resultados son a nivel transcripcional, es probable que los niveles de expresión altos en CD14 encontrados posterior al tratamiento con antifímicos en el paciente mencionado, indiquen una posible no resolución de la enfermedad tuberculosa en concordancia con los trabajos mencionados. En adición a lo anterior, se conoce que después de un tratamiento exitoso, los pacientes curados de TB presentan un riesgo muy elevado de desarrollar nuevamente la enfermedad activa; es decir, tienen 4 veces más de probabilidades de enfermarse nuevamente con respecto a nuevos casos (86). Hanneke y colaboradores en el 2006 encuentran que en los pacientes con DM2/TBPA bajo tratamiento con antifímicos, los niveles de rifampicina son 53% más bajos en comparación con pacientes con sólo TBPA; esta disminución está relacionada con un peso corporal elevado y con niveles altos de glucosa en sangre. En este sentido, esta situación podría explicar la causa de la resolución fallida de la enfermedad con un posible estado de recurrencia.

Como ya se mencionó, la característica molecular de la fase en progresión de la tuberculosis latente es una elevación inicial significativa de los niveles de expresión de los genes HP, ITGB2 y CD14 en comparación a la infección latente; posteriormente, dichos niveles descienden en forma importante, cuando sobreviene la fase activa de la infección, sobre todo en los genes HP y CD14. En la fase de progresión el gene HP se incrementó en forma significativa, sugiriendo que en este momento ya se ha dado una reactivación de la micobacteria dentro del macrófago alveolar con el inicio probable de la disgregación del granuloma.

Se conoce que una de las condiciones existentes dentro del granuloma en la infección latente por *M. tuberculosis* es un estado limitado de hierro, lo cual produce un control de la replicación de la micobacteria (87). Una de las formas que *M. tuberculosis* utiliza para acceder a fuentes de hierro para su replicación dentro del macrófago, y por lo tanto de la reactivación de la infección, es mediante la internalización a este a través del complejo hemoglobina-haptoglobina (Hp), el cual se une al receptor CD163 del macrófago lo que a su vez, induce la señalización intracelular, incrementando la actividad oxigenasa del grupo hemo y la secreción de citocinas anti-inflamatorias (IL10) (88), lo que produce una disminución de la expresión de citocinas pro-inflamatorias IFN- γ y IL12 necesarias para el mantenimiento del granuloma. Nuestros resultados sugieren que el incremento significativo de los niveles de expresión de HP en la etapa de progresión de la infección tuberculosa, puede ser debido a esta forma de adquisición del hierro por la micobacteria para su replicación. Existen datos que sugieren que un incremento en la ingesta normal de hierro está asociado con una incrementada progresión de la enfermedad tuberculosa en humanos (89). En este mismo sentido, el grupo encabezado por Estrada-García I reporta en el 2004, que cuando el hierro está presente durante la infección tuberculosa, se observa una importante reducción en la producción de TNF- α relacionado con la replicación de micobacterias dentro de la célula del huésped y que además se regula la relación entre el macrófago y la bacteria (90), lo cual podría estar directamente relacionado con el debilitamiento del granuloma en la infección latente. Por otro lado se sabe que, elevadas concentraciones de Hp (la proteína que codifica el gen HP) tiene un fuerte efecto anti-inflamatorio inhibiendo la proliferación de células T *ex-vivo* (91). El incremento de HP observado por nosotros en la fase de progresión de la TBLT podría de igual forma explicar el inicio de la progresión debido al efecto anti-inflamatorio (respuesta Th1), lo cual podría afectar de igual manera el mantenimiento de estructura de contención de la micobacteria en esta fase de la infección.

Finalmente, se ha reportado que *M. tuberculosis* regula negativamente la expresión de ICAM1 una molecular de adhesión intracelular de células CD14, reflejándose en la severidad de la enfermedad pulmonar, con bajo número de células NK ITGB2⁺ (receptor de ICAM1) y ausencia de lisis inducida por *M. tuberculosis* (92). En nuestro trabajo, observamos que en los pacientes DM2/TBPA, ICAM1 se reguló también en forma

negativa (datos no mostrados), mientras que ITGB2 se sobreexpresó en forma significativa, en relación a los pacientes con la infección latente, contrario a lo reportado en el trabajo previamente mencionado.

En resumen, en el presente trabajo identificamos un grupo de genes candidato que pueden servir como marcadores moleculares de progresión de tuberculosis latente a tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 a partir de sangre periférica completa.

Los resultados presentados aquí representan una fase inicial en el desarrollo de una prueba diagnóstica basada en la identificación de biomarcadores tempranos de progresión a enfermedad activa tuberculosa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, a partir de estudios de expresión genética en sangre total.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se identificaron los genes HP, ITGB2 y C14 como genes candidato de progresión de tuberculosis latente a tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 a partir de sangre periférica completa.
2. Los genes candidato de progresión identificados son capaces de discriminar pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ya sea en estado latente o en estado activo de la infección tuberculosa.
3. Estos marcadores moleculares de progresión presentan un alto grado de sensibilidad y especificidad, por lo que podrían ser útiles para evaluar la eficacia del tratamiento con antifímicos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2
4. Se sugieren los siguientes criterios para considerar que un paciente con diabetes mellitus tipo 2 y tuberculosis latente sin sintomatología se encuentra en un estado de progresión a la infección activa: PPD >10 mm o QFT-Gold Positivo, con una imagen normal o anormal de tórax en las placas de rayos X que sugiera o no una tuberculosis activa y por lo menos 2 de los 3 los marcadores moleculares de progresión con un valor de más de 2.0 en los niveles de expresión relativa por RT-PCR en tiempo real. Estos pacientes podrían ser candidatos para recibir tratamiento profiláctico antifímico.
5. Se identificaron dos fases de progresión de la tuberculosis latente a tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, con base en los niveles de expresión de los tres genes candidato de progresión:
 - a) Primera fase o etapa temprana de progresión: pacientes con un nivel de expresión relativa de los genes candidato de entre 2.0 y 4.0.
 - b) Segunda fase o etapa avanzada de progresión: pacientes con un nivel de expresión relativa de los genes candidato de más de 5.0.
6. Los genes predictores de progresión de tuberculosis latente a tuberculosis pulmonar activa en pacientes sin diabetes mellitus tipo 2 son diferentes a los de los pacientes DM2.

IX. PERSPECTIVAS

1. Montar una prueba diagnóstica simple utilizando los genes candidato de progresión a tuberculosis pulmonar activa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 identificados en este estudio; ya que los productos génicos de HP y CD14 son secretados por las células, una opción práctica sería mediante la técnica de ELISA utilizando suero sanguíneo.
2. Incrementar el número de individuos de los diferentes grupos de estudio para validar los genes candidato de progresión a tuberculosis activa identificados en el presente estudio; se podrían contemplar a los pacientes que tengan más riesgo de progresión de la infección: pacientes asintomáticos a la infección activa con un mal control en su diabetes, más años de evolución de ésta, PPD con una niveles de induración preferentemente de alrededor de 15 mm o más, QFT-Gold positiva, y/o con una imagen anormal de tórax en las placas de rayos X que sugiera o no una tuberculosis activa
3. Realizar ensayos de RT-PCR en tiempo real en las muestras de cDNA provenientes de pacientes del subgrupo clínico NO DM2/TBPA obtenidas en el presente trabajo, para identificar genes de progresión a TBPA en individuos sin diabetes mellitus tipo 2; con base en un análisis previo realizado por microarreglos de expresión, los genes candidato a analizar serían: MMP9, TIMP1, PGLYRP1, TNFA1P2 y PLAUR.
4. Dar seguimiento clínico-epidemiológico al paciente identificado como caso sugerente de progresión a tuberculosis pulmonar activa, así como al paciente que representa el caso confirmado de progresión; detectar una posible fase de reactivación en el primero y de recurrencia en el segundo.

X. REFERENCIAS

1. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia. 2005. 2852-2853.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement: global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country: WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA. 1999. 282: 677-686.
3. Stefan G. Tuberculosis. Infect Dis. 2004. 6: 175-195.
4. Blower SM, Small PM, Hopewell PC. Control strategies for tuberculosis epidemics: new models for old problems. Science. 1996. 273: 497-500.
5. Banyai AL. Diabetes mellitus and pulmonary tuberculosis. Am Rev Tuberc. 1931. 24: 650-67.
6. Boucot KR, Dillon ES, Cooper DA, Meier P, Richardson R. Tuberculosis among diabetics: the Philadelphia Survey. Am Rev Tuberc. 1952. 65:1-50.
7. Root H. The association of diabetes mellitus and tuberculosis. N Engl J Med. 1934. 210:1-13.
8. Dandone P. et al. J Clin Endocrin Met. 2001. 86: 3257-3265.
9. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. Diabet Med. 1997. 14: 29-34.
10. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the adult US population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey, Physician's Examiner's Training Manual. Hyattsville, Md: US department of Health and Human Services. 1994. 1988-1991.
11. Mori MA, Leonardson G, Welty TK. The benefits of isoniazida chemoprophylaxis and risk factors for tuberculosis among Oglala Sioux Indians. Arch Intern Med. 1992. 152: 547-550.
12. Ponce-De-Leon A, Garcia-Garcia M de L, Garcia-Sancho MC. Tuberculosis and diabetes in southern Mexico. Diabetes Care. 2004. 27:1584-1590.
13. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. Lancet. 2003. 362: 887-899.
14. Tapia R, Ruiz C, Ferreira E. Epidemiology of tuberculosis in Mexico. McGraw-Hill/ Interamericana. 1995. 3: 761-788.
15. Reaven G, The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. Endocrinol Metab Clin North Am. 2004. 33: 283-303.
16. Frenk J, Bobadilla JL, Sepulveda J, Lopez-Cervantes M. Health transition in middle income countries: new challenges for health care. Health Policy Plan. 1989. 4:29-39.

17. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004. 27:1047-1053.
18. National center for chronic disease prevention and health promotion diabetes surveillance system. Diabetes among Hispanics-Los Angeles County, California, 2002- 2003. *MMWR*. 2003. 52:1152-1155.
19. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, et al. Prevalence and characteristics of early-onset type 2 diabetes in Mexico. *Am J Med*. 2002. 113: 569-749.
20. Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. National Survey of Chronic Diseases (Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas). México. 1993.
21. Reaven GM. Insulin resistance: a chicken that has come to roost. *Ann N. Y. Acad Sci*. 1999. 892: 45-57.
22. Lundgren C.H. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes: A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation*. 1996. 93:106–110.
23. Yudkin, JS. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue. *Arteroscler Thromb Vasc Biol*. 1999. 19: 972–978.
24. Rivas-Santiago B, Hernández- Pando R, Carranza C, Juarez E, Leon Contreras J, Aguilar-Leon D, Torres M, Eduardo Sada. Expression of Cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and Epithelial Cells. *Infect Immun*. 2008.76: 935-941.
25. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*. 2001. 291:1544-1547.
26. Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Human β -Defensin 1: High-Throughput SNP Assays and Association with Candida Carriage in Type I Diabetics and Nondiabetics Controls. *J Clin Microbiol*. 2003. 01: 90-96.
27. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004. 84: 93-101.
28. McMurray DN, Collins FM, Dannenberg AM. Jr, Smith D.W. Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996. 215:157-179.
29. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton-antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1998. 66:176-80.

30. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996. 335:1941-1494.
31. Rook GA, Zumla A. Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2001. 7:116-123.
32. Tsukaguchi K, Okamura H, Matsuzawa K, et al. Longitudinal assessment of IFN-gamma production in patients with pulmonary tuberculosis complicated with diabetes mellitus. *Kekkaku.* 2002. 77: 409-413.
33. Tsukaguchi K, Yoneda T, Yoshikawa M, et al. Case study of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production peripheral blood monocytes in patients with diabetes mellitus complicated by pulmonary tuberculosis. *Kekkaku.* 1992. 67:755-760.
34. Madhukar P, Lee WR, Jhon MC. Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet.* 2004. 4: 761-76.
35. El sitio web: www.cellestis.com.
36. Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, Gordon SV, Hewinson RG, Burke B, Norman J, Williamson RA, Carr MD. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *The EMBO Journal.* 2005. 24: 2491-2498.
37. Lodha R, Kabra SK. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. *Indian J. Pediatr.* 2004. 71: 221-227.
38. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lungren B, Nielsen LN, Lillebaek T, Soerensen IJ, Andersen P, Welding K. Reactivation of tuberculosis during immunosuppressive treatment in a patient with a positive QuantiFERON-RD1 test. *Scand J Infect Dis.* 2004. 36: 499-501.
39. Britton WJ, Gilbert GJ, Wheatley J, Leslie D, Rothel JS, Jones SL, Bradley P. Sensitivity of human gamma interferon assay and tuberculin skin testing of detecting infection with *Mycobacterium tuberculosis* in patients with culture positive tuberculosis. *Tuberculosis.* 2005. 85:137-145.
40. Kato MM, Quian G, Peter MS. Microarray analysis of pathogens and their interaction with host. *Cellular microbiology.* 2001. 3: 713-719.
41. Jenner RG, Young RA. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature Reviews Microbiology.* 2005. 3: 281-294.
42. Kurella M, Li-Li H, Takumi Y, Jeffrey D, Randall, Gary CH, Satinder SS, Roderik VJ, Steven RG. DNA microarrays analysis of complex biologic processes. *J Am Soc Nephrol.* 2001. 12: 1072-1078.
43. Devauchelle V, Chiocchia G. What place for DNA microarray in inflammatory diseases? *Rev Med Interne.* 2004. 25:732-739.
44. van der Pouw Kraan CT, Dijkstra CD, Verweij CL. Molecular unraveling of disease by means of DNA-microarrays. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2005. 149: 626-631.

45. Bovin LF, Rieneck K, Workman C, Nielsen H, Sorensen SF, Skjodt H, Florescu A, Brunak S, Bendtzen K. Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunolo Lett.* 2004. 93: 217-226.
46. Lequerre T, Coulouarn C, Derambure C, Lefebvre G, Vittecoq O, Daveau M, Salier JP, Le Loet X. A new tool for rheumatology: large-scale analysis of gene expression. *Joint Bone Spine.* 2003. 70: 248-256.
47. Hernandez BY, Frierson HF, Moskaluk CA, Li YJ, Clegg L, Cote TR, McCuster ME, Hankey BF, Edwards BK, Goodman MT. CK20 and CK protein expression in colorectal cancer: demonstration of utility of a population-based tissue microarray. *Hum Pathol.* 2005. 36: 275-281.
48. Stremmel C, Wein A, Hohenberger W, Reingruber B. DNA microarrays: a new diagnostic tool and its implications in colorectal cancer. *Int J Colorectal.* 2002. 17: 131-136.
49. Christine A, Lacobuzio D, Raheela A, Anirban M, Volkan A, Grace, Shen O, Karin B, Michael A, John L, Charles J, Scott E, Michael G, Ralph H. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparasion of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Research.* 2003. 63: 8614-8622.
50. Lowenberg B, Delwel HR, Valk PJ. The diagnosis of acute myeloid leukaemia enhanced by using DNA microarrays. *Ned Tijdschc Geneesk.* 2005. 149: 623-625.
51. Oksjoki S, Soderstrom M, Inki P, Vuorio E, Anttila L. Molecular profiling of polycystic ovaries for markers of cell invasion and matrix turnover. *Fertil Steril.* 2005. 83: 937-944.
52. Sharma P, Shani NS, Thibshirani R, Skaane P, Urdal P, Berghaden H, Jensen M, Kristiansen L, Moen C, Sharma P, Zaka A, Arnes J, Saurer T, Akslen LA, Schlichting E, Borensen-Dale A, Lonneborg A. Early detection of breast cancer based on gene-expression patterns in peripheral blood cells. *Breast Cancer Reasearch.* 2005. 1: 634-644.
53. Word GS. cDNA micrcoarrays and cutaneous oncology. *Arch Dermatol.* 2005. 141: 631.
54. Yury SB, Philip SR, Richard AS, Jason H, Hasan AG, Keith V, Philip DB. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J clin microbiol.* 2004. 42,: 5811-5818.
55. Forrest MS, Quing L, Alan EH, Luoping Z, Roel V, Xin Z, Guilan L, YenYW, Min S, Songnian Y, Stephen JC, Nathaniel R, Martyn TS. Discovery of novel biomarkers by microarray analysis of peripheral blood mononuclear cell gene expression in bencene-exposed workers. *Toxicogenomics.* 2005. 113: 801-807.
56. Carella M, Stefano V, Paolo G. Nanotechnologies and microchips in genetic diseases. *J of Nephrol.* 2003. 16: 597-602.

57. Eaves IA, Linda SW, Paul AL, Laurence BP, John AT, Richard JG. Combining mouse congenic strains and microarrays gene expression analyses to study a complex trait: the NOD model of type 1 diabetes. *Genome Research*. 2002. 12: 232-243.
58. Busch AK, Damián C, Gareth SD, Trevor JB. Expression profiling of palmitate-and oleate-regulated genes provides novel insights into the effects of chronic lipid exposure on pancreatic β -cell function. *Diabetes*. 2002. 5: 977- 987.
59. Wang JP, Rought SE, Corbeil J, Guiney DG. Gene expression profiling detects patterns of human macrophage responses following *Mycobacterium tuberculosis* infection. *FEMS. Immunol Med Microbiol*. 2003. 28: 163-172.
60. Voisine P, Ruel M, Khan TA, Bianchi C, Xu SH, Kohane I, Libermann TA, Otu H, Saltiel AR, Sellke FW. Differences in gene expression profiles of diabetics and non diabetics patients undergoing cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. *Circulation*. 2004. 14: 280-286.
61. Mistry R, Cliff M, Clayton ChL, Beyers N, Mohamed YS, Wilson PA, Dockrell HM, Wallace DM, van Helder PD, Duncan K, Lukey PT. Gene-Expression Patterns in Whole Blood Identify Subjects at Risk for recurrent Tuberculosis. *J Infect Dis*. 2007. 195: 357-365.
62. Robin H, Tai N, Kevin Sh, H. Sho F, Alla P, Tony S, Kia P, Michael B, David D, Andy M. Fully Integrated Miniatura Device for Automated Gene Expresión DNA Microarray Processing. *Anal. Chem*. 2006. 78: 1980-1986.
63. Lynne R, Uwe O, Stewart J, Ralf W, Cynthia B, Jim S, Chris H, Danute BD, Nancy N, David T, Victor T. Stabilization of mRNA Expression in Whole Blood Samples. *Clin. Chem*. 2004. 48: 193-207.
64. Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D. Tannahill CL, Brownstein BH, Fay A, MacMillan S, Laramie J, Xiao W, Moldawer LL, Cobb J P, Laudanski K, Miller-Graziano CL, Maier RV, Schoenfeld D, Davis RW, Tompkins RG, and the Inflammation and Host Response to Injury, Large-Scale Collaborative Research Program. *Physiol. Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses Genomics*. 2004. 19: 247-254.
65. Van Gelder RN, von Xastrow ME, Yool A, Dement DC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990: 87: 1663-1667.
66. Debey S, Zander T, Brors B, Popov A, Eils R, Schultze JL. A highly standardized, robust, and cost-effective method for genome-wide transcriptoma analysis of peripheral blood applicable to large-scale clinical trials. *Genomics*. 2006. 87: 653-664.
67. Goss-Tusher V, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 2001. Vol 98. No. 9. 5116-5121.

68. Pfaffl, MW, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29 (9): 2002-2007.
69. Yerushalmy J. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. *Pub Health Rep*. 1947. 62: 1432-49.
70. Brothell D, Sambrook J. *DNA Microarrays a molecular cloning manual*. CSHL Press. Cold Spring Harbor, New York. 2003. Pag. 545.
71. Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese JC, Hernandez-Boussard T, Rees CA, Cherry JM, Botstein D. SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic Acid Res*. 2003. 31: 219-223.
72. Beamer G L, David K F, Bridget V, Turner J. Peripheral Blood Gamma Interferon Release Assays Predict Lung Responses and *Mycobacterium tuberculosis* Disease Outcome in Mice. *Clin. Vaccine Immunol*. 2008. 474-483.
73. Devey S, Shoenbeck U, Hellmich M, Gathof BS, Pillai R, Zander T, Schultze JL. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenom J*. 2004: 4. 193-207.
74. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Moser K, Ortmann WA, Espe KJ, Balasubramanian S, Hughes KM, Chan JP, Begovich A, Chang SY, Gregersen PK, Behrens TW. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun*. 2004: 5. 347-353.
75. Polacek DC, Passerini AG., Shi C, Francesco NM, Manduchi E, Grant GR., Powell S, Bischof H, Winkler H, Stoeckert CJ Jr, Davies PF. Fidelity and enhanced sensitivity of differential transcription profiles following linear amplification of nanogram amounts of endothelial mRNA. *Physiol Genomics*. 2003: 13. 147-156.
76. Cobb JP, Mindrinos MNA, Miller-Graziano C, Calvano SE, Baker HV, Xiao W, Laudansky K, Brownstein BH, Elson, CM, Hayden DL, Herndon DN, Lowry SF, Maier RV, Schoenfeld DA, Moldawer LL, Davis RW, Tomkins RG, and Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program. Application of genome-wide expression analysis to human health and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. 102: 4801-4806.
77. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, Neher A , Feldmann K, Mollenkopf HJ , Ziegler A, Kaufmann SHE. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Med*. 2006.

78. Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, Krutzik SR, Bloom BR, Ganz T, Modlin R L, Stenger S. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol.* 2006. 177: 1864-1871.
79. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2007. 85: 103-111.
80. Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Rosers S, Roman J. Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathog.* 2000. 29: 231-244.
81. Sheen P, O’Kane CM, Chaudhary K, Tovar M, Santillan C, Sosa J, Caviedes L, Gilman RH, Stamp G, Friedland JS. High MMP-9 activity characterises pleural tuberculosis correlating with granuloma formation. *Eur Respir J.* 2009. 33:134-141.
82. Siddiqi K, Lambert ML, Walley J. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis.* 2003. 3: 288-296.
83. Pacheco E, Fonseca C, Montes C, Zabaleta, García JLF, Arias MA. CD14 gene promoter polymorphism in different clinical forms of tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004. 40: 207-213.
84. Juffermans NP, Verbon A, Van Deventer SJH, Buurman WA, van Deutekom H, Speelman P, van Der Poll T. Serum concentrations of lipopolysaccharide activity-modulating proteins during tuberculosis. *J Infect Dis.* 1998. 178: 1839-1842.
85. Zhang Y, Doerfel M, Lee TC, Guillermin B, Rom WN. Mechanisms of stimulation of IL-1 beta and TNF-alpha by *M. tuberculosis* components. *J Clin Invest.* 1993. 91: 2076-2083.
86. Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M, van der Spuy GD, Borgdorff MW, Enarson DA, Behr M A, van Helden PD. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005. 171: 1430–1435.
87. Appelberg R. Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *J Leukoc Biol.* 2006. 79: 1117-1128.
88. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004. 117: 285-297.
89. Kasvosve I, Gomo ZA, Mvundura E, Moyo VM, Saungweme T, Khumalo H, Gordeuk VR, Boelaert JR, Delanghe JR, et al. Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000. 4:771–775.
90. Serafin-López J, Chacón-Salinas, Muñoz-Cruz S, Enciso-Moreno JA, Estrada-Parra SA, Estrada-García I. The effect of iron on the expression of cytokines in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 2004. 60: 329-337.

91. Arredouani M, Mmatthijs P, Vann-Hoeyveld E, Kasran A, Baumann H, Ceuppens JL, Stevens E. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *immunology*. 2003.108: 144-151.
92. Schierloh P, Alemán M, Yokobori N, Alves L, Roldán N, Abbate E, Sasiain MC, de la Barrera S. NK cell activity in tuberculosis is associated with impaired CD11a and ICAM-1 expression: a regulatory role of monocytes in NK activation. *Immunol*. 2005. 116: 541-552.

XI. APÉNDICE

XI.1. Procedimiento para la identificación, mediante bioinformática, de los genes humanos homólogos a genes de ratón, involucrados en la infección pulmonar activa por *Mycobacterium tuberculosis*.

La búsqueda de los correspondientes genes de ratón homólogos en el humano se llevó a cabo mediante las tres siguientes fuentes en la Internet: 1) SOURCE STANFORD; 2) ENTREZ NUCLEOTIDE y 3) PUBMED.

1. SOURCE STANFORD. La página está disponible en la siguiente dirección: <http://source.stanford.edu>.

En la página de SOURCE STANFORD aparecen tres ventanas:

- a) En la ventana: **Enter A Search Term**, se introdujo la clave de la clona (ej.: U57524).
- b) En la ventana: **Choose search option**, se seleccionó **Gene Bank Accession Num.**
- c) En la ventana: **Choose organism**: se seleccionó ***Mus musculus***. Utilizando el botón **Submit** se inició la búsqueda del gen de ratón que corresponde a la clona de interés. Si de esta forma se tiene acceso a la información buscada, entonces aparece la página del gen de ratón correspondiente, indicando, entre otros datos, el símbolo (ej.: Tnfrsf9) y el nombre del gen (ej.: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, mRNA).

Para realizar la búsqueda del gen homólogo en humano, se copió el símbolo del gen (ej.: Tnfrsf9), se seleccionó el botón: S.O.U.R.C.E. Search, y apareció nuevamente la página de SOURCE STANFORD correspondiente a ***Homo sapiens***; se seleccionó **Gene Name /Symbol** en la ventana: **Choose search option** y mediante el botón **Submit** se inició la búsqueda del gen homólogo de humano. Apareció la página del gen humano, indicando, entre otros datos, el símbolo (ej.: TNFRSF9) y el nombre del gen (ej.: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9). La página de cada gen de interés se guardó en una carpeta exclusiva para genes homólogos de humano.

2. ENTREZ NUCLEOTIDE. En caso de que con SOURCE no se pueda tener acceso a la información requerida, puede lograrse entrando a la página de Entrez nucleotide.

En ésta aparecen dos ventanas: Search y for. En la primera se seleccionó, ya sea Gene o bien Homologen, y en la segunda se introdujo el símbolo del gen de ratón (ej.: procr). Mediante el botón Go se inició la búsqueda del gen homólogo de humano. Aparece una lista del gen correspondiente de varias especies, incluyendo la de *H. sapiens*. Seleccionar HomoloGene: 4670. Gene conserved in Eutheria y aparecen las diferentes ligas de las diferentes especies. Se seleccionó la correspondiente a *H. sapiens*

PROCR, y apareció la página del gen: PROCR protein C receptor, endothelial (EPCR) [Homo sapiens]. La página de cada gen de interés se guardó en la carpeta exclusiva para genes homólogos de humano.

3. PUBMED. En el caso de que por las vías anteriores no se pueda tener acceso a la información buscada, entonces se puede buscar el nombre o símbolo del gen en la página de PubMed.

Se introdujo el nombre del gen de interés en la ventana for (ej.: Adiponectin) asegurándose de que en la ventana de Search esté seleccionado PubMed. Se inició la búsqueda seleccionando el botón Go, apareciendo las publicaciones en las que está incluido este gen, y entonces se busca el nombre o símbolo del mismo (ej.: ACDC). Al contar con el nombre o símbolo del gen, éste se busca mediante SOURCE STANFORD O ENTREZ NUCLEOTIDE.