

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y a mi papá por el apoyo, a mis hermanas por la preocupación y el apoyo brindado durante el proyecto.

A todos los miembros del laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental, IVIC, en especial a la Dra. Mercedes, quien no solo fue mi mentor sino mi soporte en todo momento, a la Dra. Eva por su comprensión y su apoyo, al Lic. Fernando por su paciencia, asesoría, entrenamiento y apoyo y al Lic. Omar por su ayuda en diferentes tareas. Junto a todos ellos crecí como profesional y como persona.

A mi novio Freiry y a mis amigos Alfredo, Andrea, Adriana e Isabel por su preocupación, paciencia y comprensión durante la realización de este proyecto.

Al CRP-ICGEB Research Grant (CRP/VEN11-01) por el financiamiento del trabajo especial de grado.

Gracias...

RESUMEN

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, afectando principalmente los pulmones y originando así la tuberculosis pulmonar. Las últimas estimaciones, incluidas en el reporte de la Organización Mundial de la Salud, indican que en el año 2013 ocurrieron 9.0 millones de casos nuevos y 1,5 millones de muertes por tuberculosis. La primera interacción entre *Mycobacterium tuberculosis* y el hospedador ocurre en el alveolo pulmonar, donde el bacilo es fagocitado por células dendríticas y macrófagos. Como respuesta a la infección el individuo desarrolla una respuesta inmunitaria, que incluye la activación de macrófagos que producirán óxido nítrico (NO) para controlar la infección. Algunos individuos infectados logran eliminar el bacilo, pero otros no, desarrollando así TB latente y en algunos casos TB activa. El NO es generado por la enzima óxido nítrico sintasa 2/inducible (NOS2/ iNOS) codificada por el gen *NOS2A* en humanos. En la región promotora del gen *NOS2A* se ha identificado diferentes polimorfismos, que afectan la unión de factores de transcripción, afectando las concentraciones de NO. Considerando que la variante -954G/C ha sido asociada con la producción de NO y el desarrollo de tuberculosis, evaluamos el polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A* en pacientes venezolanos con TB pulmonar. Para ello, se estudiaron 69 pacientes con TB pulmonar y 94 individuos aparentemente sanos, que han estado expuestos a *Mycobacterium tuberculosis*. Nuestros resultados demostraron la ausencia de diferencias significativas en las frecuencias de los genotipos y alelos de -954G/C de *NOS2A* entre controles y pacientes con tuberculosis. Asimismo, no encontramos una correlación entre los distintos genotipos -954G/C y la concentración de nitritos en plasma. Sin embargo, observamos en el grupo de controles PPD+ altas concentraciones de nitritos.

En conclusión, la producción de óxido nítrico estaría controlando la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y la presencia de otras variantes del gen *NOS2A* pudiese estar determinando las concentraciones del mismo.

ABREVIACIONES

ADN= Ácido desoxirribonucleico.

AP-1= Proteína activadora 1.

A= Adenina.

Agr1= Arginasa 1.

ARNm= Ácido ribonucleico mensajero.

BCG= Vacuna a partir de *Mycobacterium bovis* (“Bacillus de Calmette y Guérin”).

C= Citocina.

CD207= Receptor de manosa.

CR3= Receptor del complemento 3.

DC= Células Dendrítica.

DC-SIGN= Receptor de molécula de adhesión intracelular específica de células dendríticas.

G= Guanina.

IC= Intervalo de Confianza.

IFN- γ = Interferón gamma.

IL-1= Interleuquina 1.

IL-10= Interleuquina 10.

IL-8= Interleuquina 8.

IL-12= Interleuquina 12.

IL-15= Interleuquina 15.

IRF -1= Factor regulador de interferón

ISGF-3= Complejo factor 3 gamma estimulado por interferón.

IVIC= Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

LAM= Lipoarabinomano.

LM= Lipomannan.

LTBI= Infección tuberculosa latente (“ Latent Tuberculosis Infection”).

ManLAM= Lipoproteína LprG.

MHC= Complejo Principal de Histocompatibilidad (“Major Histocompatibility Complex”).

NADPH= Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NF- κ B= Factor de transcripción nuclear κ B.

NLB= Buffer de lisis nuclear (“Nuclear lysing buffer”).

NOD= Receptor dominio de oligomerización de nucleótido.

NO= Óxido nítrico.

NOS1= Óxido nítrico sintasa neuronal.

NOS2= Óxido nítrico sintasa inducible.

NOS3= Óxido nítrico sintasa endotelial.

NK= Linfocitos citotóxicos naturales (Natural Killer)

OR= odd ratio (relación de probabilidad).

PAMPs= Patrones moleculares asociados a patógenos.

PCR= Reacción en cadena de polimerasa.

PPD= Prueba de tuberculina (“Purified Protein Derivative”).

PRRs= Receptores de reconocimiento de patógenos.

RCLB= Buffer de lisis de células rojas (“Red cell lysis buffer”).

RNI= Reactivos intermediarios del nitrógeno.

SIDA= Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SNP= Polimorfismo de un solo nucleótido.

SP-A= Receptor proteína surfactante A.

STAT1= Activador de la transcripción proteína 1.

T= Timina.

TB= Tuberculosis.

TLRs= Receptores tipo Toll.

TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa.

VHI= Virus de inmunodeficiencia adquirida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABREVIACIONES	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	14
TRANSMISIÓN DEL <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
ENFERMEDAD DE TUBERCULOSIS	16
MECANISMOS DE ENTRADA DE <i>M. tuberculosis</i>	18
RESPUESTA INMUNITARIA DEL HOSPEDERO AL <i>M. tuberculosis</i>	19
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA 2 O INDUCIBLE (<i>NOS2</i>).....	23
REGULACION DE LA EXPRESIÓN DE <i>NOS2</i>	26
GEN <i>NOS2A</i>	29
POLIMORFISMO DE <i>NOS2A</i>	30
PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN INFECCIONES MICOBACTERIANAS.....	33
ANTECEDENTES	35
PAPEL DE NO EN TUBERCULOSIS	35
PAPEL DE <i>NOS2</i> EN TUBERCULOSIS	36
PAPEL DEL POLIMORFISMO <i>NOS2A-G954C</i> EN TUBERCULOSIS	36

OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1. Selección de pacientes con TB	40
2. Selección del grupo control	42
3. Extracción de ADN genómico.....	42
4. Ajuste del ADN	43
5. Calidad del ADN	44
6. Método para el análisis del polimorfismo.....	44
6.1. PCR-RFLP del polimorfismo -954G/C del gen <i>NOS2A</i>	44
7. Determinación de las concentraciones de nitrito	47
8. Análisis estadísticos.....	50
RESULTADOS	52
1. Características del grupo de pacientes	52
2. Características del grupo control.....	52
3. Calidad del ADN.....	52
4. Amplificación de la región del gen <i>NOS2A</i> con la variante -954G/C	53
5. Digestión del producto amplificado.....	54

6. Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) para la distribución genotípica del polimorfismo -954 G/C del gen <i>NOS2A</i> en individuos aparentemente sanos y pacientes con TB.	54
7. Distribución de la frecuencias alélicas y genotípicas del gen <i>NOS2A</i> en individuos sanos y pacientes con TB	55
8. Comparación de frecuencias de los genotipos y alelos del polimorfismo -954G/C del gen <i>NOS2A</i> entre el grupo de pacientes con TB y controles	56
9. Concentraciones de nitritos en sueros de pacientes con TB e individuos sanos....	60
10. Correlaciones entre concentraciones de nitritos y genotipos -954G/C del gen <i>NOS2A</i> en pacientes con tuberculosis	62
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Progresión del curso natural de los eventos y el resultado en un individuo inmuno-competente tras la exposición a gotitas de Flügge	17
Figura 2 Conversión de la L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico, catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa.....	24
Figura 3 Representación esquemática del gen <i>NOS2A</i> . El gen consta de 1-27 exones.....	29
Figura 4 Representación esquemática de la región promotora del gen <i>NOS2A</i>	31
Figura 5 Representación esquemática de polimorfismo en la región promotora del gen.....	32
Figura 6 Diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Norma del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis. MSDS, 2005.....	41
Figura 7 Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X	53
Figura 8 Visualización del producto amplificado del gen <i>NOS2A</i> en gel de agarosa (1.5%) en buffer TBE 1X	53
Figura 9 Visualización de los productos obtenidos de la digestión del producto amplificado de 574 pb del gen <i>NOS2A</i> con la enzima <i>BsaI</i>	54
Figura 10 Concentraciones de nitritos en sueros de pacientes (n=45) y controles (n=75)...	61
Figura 11 Concentraciones de nitritos en sueros de Pacientes (n=45) y controles PPD positivos (n=75).....	62

Figura 12 Concentraciones de nitritos en suero de pacientes con distinto genotipo NOS2A-G954C.....	63
Figura 13 Diagrama esquemático de las primeras 2500 pb de la región promotora del gen NOS2A	65
Figura 14 Esquema general de la síntesis, regulación y función anti-microbiana de NO en infección por micobacterias.....	68
Figura 15 Efecto del NO en las células del sistema inmunitario.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Papel del polimorfismo de <i>NOS2A</i> en diferentes enfermedades infecciosas	33
Tabla 2 Polimorfismos del gen <i>NOS2A</i> en Tuberculosis	38
Tabla 3 Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de <i>NOS2A-954G/C</i> y el tamaño del producto amplificado	45
Tabla 4 Patrón de digestión para la asignación de los genotipos del SNP - <i>954G/C NOS2A</i> ...	46
Tabla 5 Curva estándar NaNO_2	48
Tabla 6 Curva estándar KNO_3	48
Tabla 7 Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg para los grupos control y pacientes.....	55
Tabla 8 Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo - <i>954G/C</i> del gen <i>NOS2A</i> en el grupo control y pacientes TB	56
Tabla 9 Frecuencias genotípicas del polimorfismo - <i>954G/C</i> del gen <i>NOS2A</i> entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD	57
Tabla 10 Comparaciones de frecuencias genotípicas del polimorfismo - <i>954G/C</i> del gen <i>NOS2A</i> entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD	58
Tabla 11 Frecuencias alélicas del polimorfismo - <i>954G/C</i> del gen <i>NOS2A</i> entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD	59

Tabla 12 Comparaciones de frecuencias alélicas del polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A* entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD..... 59

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta patología afecta principalmente los pulmones (TB pulmonar), pero puede afectar otros órganos (TB extra-pulmonar). En general, una pequeña proporción de personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* desarrollarán la enfermedad, sin embargo, la probabilidad de desarrollar TB es mucho mayor entre personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Además, la TB es más común en hombres que en mujeres y afecta, principalmente, adultos en los grupos etarios económicamente productivos y se estima que alrededor de dos tercios de los casos ocurren en personas con edades comprendidas entre 15-59 años (WHO, 2011). Las últimas estimaciones, incluidas en el reporte de la Organización Mundial de la Salud, indican que en el año 2013 ocurrieron 9.0 millones de casos nuevos y 1,5 millones de muertes por tuberculosis (1.1 millones de muertes entre personas VIH negativas y 0.4 millones de muertes entre personas VIH positivas) (WHO 2014). Estas cifras son superiores a las notificadas en el Global Tuberculosis Report 2013 (WHO, 2013). Aunque la mayoría de los casos de tuberculosis y las muertes ocurren en hombres, la carga de la enfermedad entre las mujeres también es alta. En 2013, se estimó 3,3 millones de casos y 510 mil muertes por tuberculosis entre las mujeres, así como 550 mil casos y 80 mil muertes entre niños (WHO, 2014). Es inaceptable la alta mortalidad por tuberculosis, ya que la mayoría de las muertes se pueden prevenir si las personas acceden a servicios de atención médica, que proporcionarán el diagnóstico y el tratamiento correcto. Además, regímenes de corta duración de fármacos de primera línea, que pueden curar alrededor del 90% de los casos, han estado disponibles durante décadas. (WHO, 2014).

TRANSMISIÓN DEL *Mycobacterium tuberculosis*

El mecanismo de transmisión más importante y el que causa casi la totalidad de los contagios, es la vía aerógena. El individuo infectado al hablar, toser y estornudar elimina pequeñas microgotas en forma de aerosoles cargadas de micobacterias (Revisado en: Yoshimura, A., 2012). La infección es iniciada por la inhalación de microgotas (gotitas de Flügge), las cuales son partículas de 1–5 μm de diámetro que contienen *M. tuberculosis* y que son expectoradas por pacientes con TB pulmonar activa (TB abierta), típicamente cuando los pacientes tosen. La microgota, debido a su pequeño tamaño, puede permanecer suspendida en el aire por varios minutos a horas. El riesgo de infección va depender de varios factores, tales como la capacidad de infección del caso índice, la cercanía del contacto, la carga bacilar inhalada, y el estado inmunitario del hospedero potencial. La ruta primaria de la infección involucra los pulmones (Frieden, T., y col, 2003). La microgota inhalada evita las defensas del bronquio debido a su pequeño tamaño y penetra en el alveolo terminal donde ellas son engullidas por células inmunitarias fagocíticas (macrófagos y células dendríticas). *M. tuberculosis* puede, además, infectar células no fagocíticas en el espacio alveolar, incluyendo las células M, endotelial alveolar, células epiteliales tipo 1 y tipo 2 (neumocitos). En la fase temprana de la infección, el *M. tuberculosis* internalizado por células inmunitarias fagocíticas se replica intracelularmente y las células inmunitarias cargadas de bacterias pueden cruzar la barrera alveolar para causar la diseminación sistémica. La replicación intracelular y la diseminación simultánea del patógeno a los nódulos linfáticos y a otros sitios extra-pulmonares ocurren previas al desarrollo de las respuestas inmunitarias adaptativas. Esto ejemplifica la extraordinaria habilidad de *M. tuberculosis* para establecer un nicho donde ellos pueden evitar la

eliminación por el sistema inmunitario y persistir indefinidamente (Teitelbaum, R., y col, 1999; Bermúdez, L., y col, 2002).

ENFERMEDAD DE TUBERCULOSIS

La mayoría de los individuos infectados desarrollan una respuesta inmunológica efectiva entre las 2-8 semanas después de la infección, deteniendo la multiplicación del bacilo. Los linfocitos T activados, los macrófagos y otras células del sistema inmunitario forman el granuloma, que limita la multiplicación y propagación del bacilo. La mayoría de los bacilos de *M. tuberculosis* mueren en los granulomas, deteniendo el progreso de la enfermedad. Las micobacterias que escapan, de la destrucción intracelular inicial, se multiplicarán, lo que resulta en la progresión de la infección tuberculosa latente (“LTBI” Latent Tuberculosis Infection) o el desarrollo de la tuberculosis activa, (Figura 1). Las personas con tuberculosis activa pueden transmitir la enfermedad a otras personas, mientras que las que tienen LTBI no la transmiten, ni muestran ningún signo patológico de la enfermedad, a pesar de ello, la infección tuberculosa latente puede reactivarse, inclusive años después de la infección inicial, desarrollando Tuberculosis activa (Revisado en: Ahmad, S., 2010).

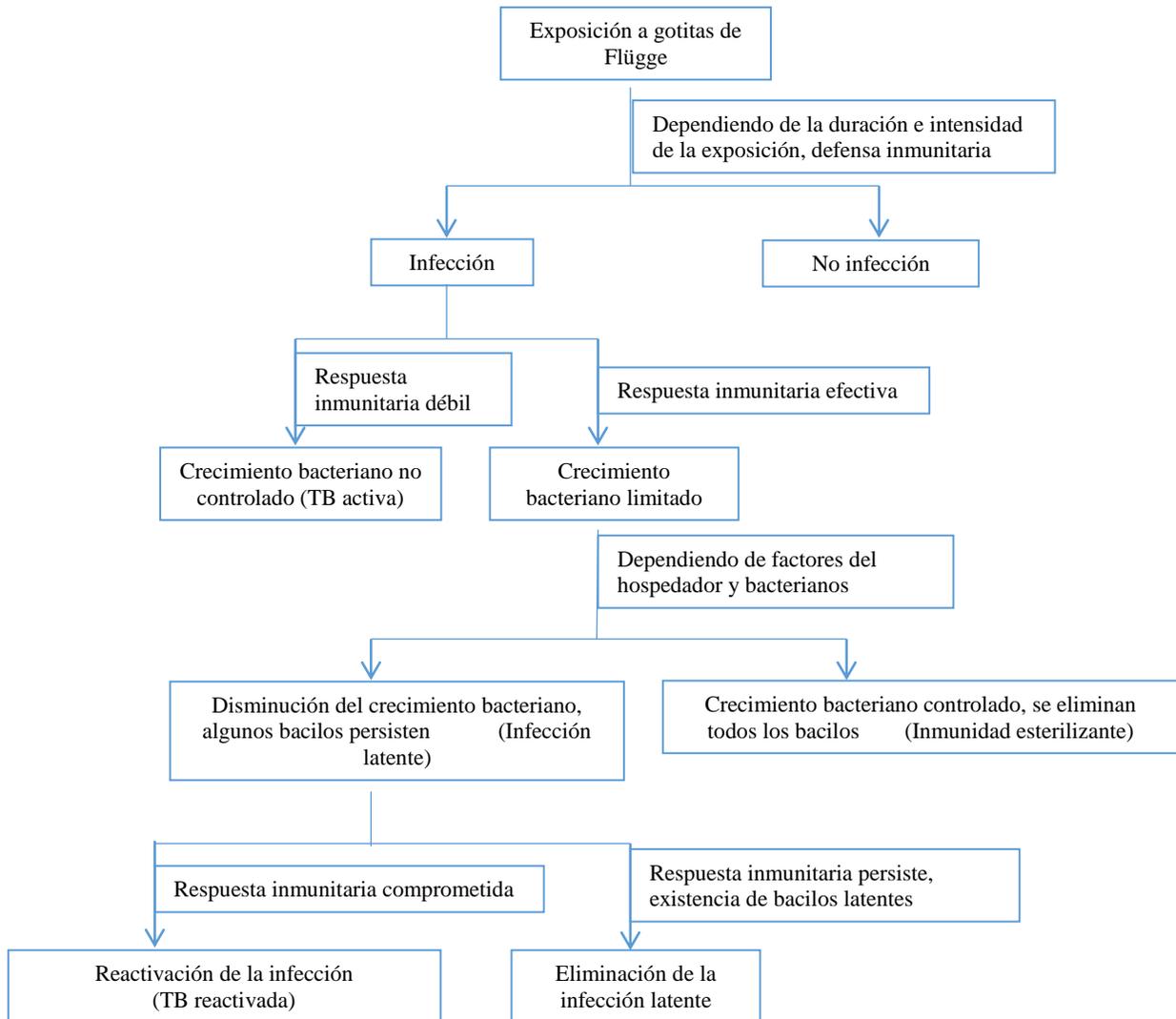


Figura 1. Progresión del curso natural de los eventos y el resultado en un individuo inmuno-competente tras la exposición a gotitas de Flugge, que contienen *M. tuberculosis* expectoradas por un individuo con TB pulmonar activa y baciloscopia positiva (Ahmad, S., 2010).

MECANISMOS DE ENTRADA DE *M. tuberculosis*

La infección comienza con la fagocitosis del bacilo por las células dendríticas y los macrófagos, ubicados en el alveolo. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) en las células del hospedador son fundamentales para el inicio de la respuesta inmunitaria (Akira, S., y Takeuchi, O., 2006).

La detección inicial de *Mycobacterium tuberculosis* involucra receptores expresados en células presentadoras de antígenos fagocíticas, incluyendo varios receptores toll (TLRs), el receptor dominio de oligomerización de nucleótido (NOD), receptores de complemento, el receptor de manosa (MR) (CD207), el receptor molécula de adhesión intracelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) (CD209), el receptor de proteína surfactante A (SP-A), el receptor scavenger clase A, la lectina unidora de manosa (MBL), y posiblemente dectina-1 (Revisado en Arentz, M. y Hawn, T., 2007)

El primer evento de interacción entre *M. tuberculosis* y la célula del hospedador está mediado por los TLR, en especial TLR2, TLR4 y TLR9. Los TLRs son una familia de proteínas transmembrana que se expresan en células del sistema inmunitario, como macrófagos, células dendríticas, células B y T, y en células no inmunitarias, como fibroblastos y células epiteliales. Los PAMPs localizados, principalmente, en la pared celular de la micobacteria y que estimulan a los TLRs incluyen: las lipoproteínas de 19 y 27 kDa, glicoproteínas de 38 kDa, lipomannan (LM) y lipoarabinomannan y la lipoproteína LprG (ManLAM) (Jo, E., 2008; Harding, C., y Boom, W., 2010). La estimulación de los TLRs en la superficie de los macrófagos guía al reclutamiento de varias proteínas adaptadoras, incluyendo MyD88 (proteína de diferenciación mieloide 88), TIRAP / MAL

(adaptador que contiene el dominio TIR / adaptador similar a MyD88), TICAM1/TRIF (molécula adaptadora 1 conteniendo dominio TIR/ adaptador inductor de interferón beta conteniendo dominio TIR) y TRAM (molécula adaptadora relacionada a TRIF). Este reclutamiento guía a la activación de una serie de moléculas, de las vías de señalización, que culminan en la traslocación del factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) al núcleo y la activación de los genes de la respuesta inmunitaria, tales como citocinas, quimocinas y óxido nítrico sintasa. (Revisado en: Arentz, M. y Hawn, T., 2007). Sin embargo, el bacilo ha desarrollado múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria innata y adaptativa del hospedero, incluyendo la inhibición de la maduración del fagosoma, resistencia a mecanismos microbicidas innatos y a defensas del hospedero mediadas por citocinas, e inhibición de la presentación de antígeno (Harding, C y Boom, W, 2010)

RESPUESTA INMUNITARIA DEL HOSPEDERO AL *M. tuberculosis*

La interacción entre PRRs de *M. tuberculosis* y los TLRs en macrófagos conlleva a la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa\beta$ y ésta a la producción de quimocinas y citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-12 (IL-12) que sirven de señal para que monocitos, neutrófilos y linfocitos [células T y linfocitos citotóxicos naturales (NK)] migren al sitio de la infección, pero no son capaces de matar las bacterias de manera eficiente. Durante este tiempo los bacilos resisten los mecanismos bactericidas del macrófago mediante la inhibición de la fusión del fagosoma-lisosoma, multiplicándose el bacilo en el fagosoma y generando necrosis del macrófago. Los bacilos liberados se multiplican en el medio extracelular, donde son fagocitados por otros macrófagos, que también fallan en controlar la replicación de *M. tuberculosis* (Revisado en: Ahmad, S.,

2010). Por otro lado, las células dendríticas (DC), que fagocitaron bacilos, maduran y migran a los ganglios linfáticos centrales, donde realizan la presentación antigénica a las células T (CD8⁺ y CD4⁺). Las células T maduras migran al sitio de infección, guiadas por las quimoquinas producidas por las células infectadas. La acumulación de macrófagos, células T y otras células del hospedero (células dendríticas, neutrófilos, células NK, fibroblastos, células endoteliales, y células del estroma) conduce a la formación del granuloma en el sitio de infección. Las paredes del granuloma limita la propagación bacteriana y proporciona un microambiente para la interacción entre macrófagos, otras células del sistema inmunitario y citocinas producidas por éstas células (Bodnar, K., y col, 2001; González-Juarrero, M., y col, 2001). Las células T CD4⁺ cooperadoras localizadas en el granuloma producen interferón gamma (IFN- γ) y van a reconocer macrófagos infectados mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, presentación antigénica), induciendo la apoptosis de dichos macrófagos y deteniendo el progreso de la infección. Sin embargo, algunos bacilos son capaces de sobrevivir a las condiciones estresantes, generadas en el hospedador frente a la infección, evitando la eliminación por el sistema inmunitario y entrando en un estado de latencia. Algunos individuos eliminan la infección por completo (inmunidad esterilizante) mientras que otros promueven la existencia de *M. tuberculosis* (Revisado en: Ahmad, S., 2010).

El microambiente del granuloma es hipóxico, con bajo pH, presencia de óxido nítrico y monóxido de carbono. Las condiciones del granuloma aumenta la expresión de varios genes de *M. tuberculosis* involucrados en la inducción de la latencia. Los bacilos latentes pueden habitar en el granuloma del hospedero por muchísimos años y son capaces de romper la latencia cuando ocurre inmunodepresión (Ulrichs, T y Kaufman, S., 2006).

Durante la infección con *M. tuberculosis* participan varios linfocitos, como células T $\alpha\beta$ (CD8⁺ y CD4⁺), células T restringidas por CD1, células T $\gamma\delta$ y células T citotóxicas, así como las citocinas producidas por estas células. Las células T CD4⁺ son las células más importantes durante la respuesta a la infección de *M. tuberculosis*, así como la citocina IFN- γ que segrega al estar activada. Las células NK y T CD8⁺ también producen IFN- γ (Caruso, A., y col, 1999; Cooper, A., 2009).

Las células T CD4⁺ llevan a cabo varias funciones que son importantes para controlar la infección en el granuloma, por ejemplo: la apoptosis de los macrófagos infectados a través del ligando Fas (FasL), la producción de otras citocinas, como IL-12 y TNF- α , la activación de células inmunitarias, como macrófagos y células dendríticas, para producir citocinas inmunoreguladoras, como interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-12 (IL-12) e interleuquina-15 (IL-15) y la activación de los macrófagos a través del ligando CD40. Además, las células T CD4⁺ pueden controlar el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* por un mecanismo dependiente de óxido nítrico, independiente de la producción de IFN- γ (Wolf, A., y col, 2008; Young, D., y col, 2009).

Las células T CD8⁺ inducen citotoxicidad en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* mediante granulosa, facilitando el control de la infección aguda y la crónica (Cooper, A., 2009).

Las células T no convencionales, como células T restringidas a CD1 y células T $\gamma\delta$ contribuyen a la protección contra *M. tuberculosis*. Las células T restringidas a CD1 reconocen glicolípidos, como LAM (lipoarabinomanano), en la pared del bacilo, además,

la proteína CD1 es capaz de presentar antígenos lipopeptídicos y lipídicos a células T, por lo tanto juega un papel importante contra *M. tuberculosis* (Barral, D., y Brenner, M., 2007).

El IFN- γ es una citocina clave para la respuesta inmunitaria frente a *M. tuberculosis*, esta citocina incrementa la presentación antigénica que conlleva al reclutamiento de células T CD4⁺, T CD8⁺ y NK e induce la transcripción de 200 genes en macrófagos, incluyendo la sobre expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MCH clase II) y la producción de efectores antimicrobianos, como los radicales de oxígeno y óxido nítrico (Cooper, A., 2009).

El TNF- α producido por los macrófagos, DC y células T, es otra citocina importante que participa en la respuesta protectora inmunitaria ante *M. tuberculosis*. IFN- γ y TNF- α en conjunto incrementan las funciones antimicrobianas de los macrófagos durante la respuesta inmunitaria. Estas funciones antimicrobianas están dadas por la producción de óxido nítrico. TNF- α también inicia la migración celular y la formación del granuloma. El TNF- α producido por macrófagos infectados induce la expresión de quimocinas, como interleuquina-8 (IL-8), MCP-1 (CCL2) y RANTES (CCL5), además, proporciona señales para la migración de células inmunitarias al sitio de infección (Cooper, A., 2009; Chan, J., y Flynn, J., 2004; Algood, H., y col, 2003).

La IL-12 también juega un papel importante en la defensa contra *M. tuberculosis*. IFN- γ y TNF- α se producen abundantemente por células T CD4⁺ bajo la influencia de IL-12 (Cooper, A., 2009; Chan, J., y Flynn, J., 2004).

ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA 2 O INDUCIBLE (NOS2)

Varios tipos celulares sintetizan óxido nítrico (NO), entre ellos, los fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos y células del sistema inmunitario, como monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC), células citotóxicas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos (Coleman, J., 2002). NO es una molécula gaseosa a temperatura ambiente y altamente reactiva, lo que hace difícil su detección directa, por lo general se mide la concentración de nitritos y nitratos como producto final y estable del óxido nítrico. Esta molécula presenta funciones de vasodilatación, inhibición de la agregación de plaquetas y neurotransmisión. Altas concentraciones pueden ser tóxicas para el organismo, contribuyendo de esta forma en la patogénesis de enfermedades, como TB (Rodríguez, M., 1998).

Recientemente, el conocimiento del papel de NO en el sistema inmunitario ha sido enriquecido por descubrimientos fascinantes, los cuales incluyen: 1- la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) por factores del microambiente, 2- la función del NO derivado del patógeno bacteriano, producido por la enzima óxido nítrico sintasa bacteriana (NOSb), el cual modula y evade la defensa del hospedero y 3- el control, dependiente de NO, de patógenos por depleción de micronutrientes. Además, estudios recientes han proporcionado nuevas evidencias del efecto de NO exógeno o endógeno en la diferenciación de subgrupos de células T cooperadoras y en la comunicación dependiente de NOS2 entre células mesenquimales y células T (Revisado en: Bogdan, C., 2015).

La enzima óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) es una enzima homodimérica que, al igual de las otras isoformas de NOS, produce óxido nítrico a través de una reacción compleja de óxido reductasa (Figura 2). (Bugner, D., y col 1999). Las tres enzimas NOS son catalíticamente

activas cuando dimerizan y requieren dos sustratos, L-arginina y oxígeno molecular, en combinación con varios cofactores, incluyendo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleotido (FMN) y (6R)5, 6, 7, 8- tetrahidro-L-biopterina (BH4) para generar NO (Revisado en: Mattila, J.T., y Thomas, A.C., 2014). Por lo tanto, el NO es sintetizado por una reacción enzimática de dos pasos que involucra una mono-oxigenasa. En el primer paso se oxida el nitrógeno del grupo guanidino del aminoácido L-arginina, para producir N^ω-OH-L-arginina como un intermediario. En el segundo paso este intermediario es oxidado para formar una molécula de NO y L-citrulina. Cabe destacar, que la L-arginina (un aminoácido esencial) se obtiene de fuentes exógenas (alimentos) y endógenas, incluyendo la degradación de proteínas en todo el cuerpo y, en menor medida, la síntesis de novo de citrulina por argino-succinato sintasa renal. (Yang,C.S., y col., 2009).

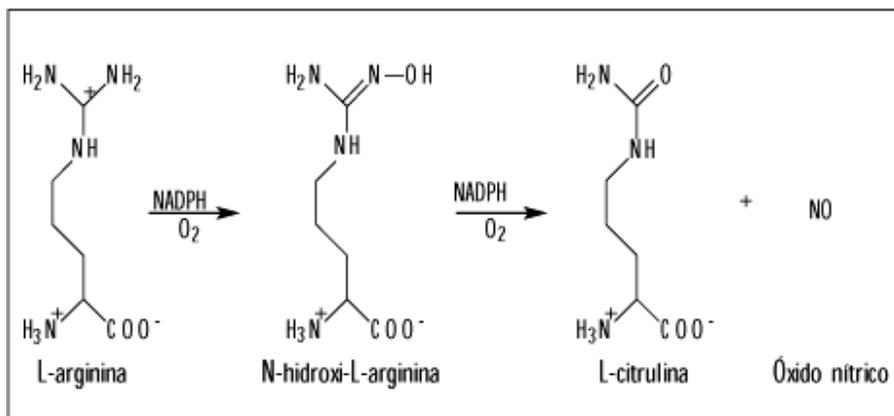


Figura 2. Conversión de la L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico, catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa. Primero ocurre la oxidación de uno de los nitrógenos del grupo guanidino de la L-arginina, requiriéndose oxígeno molecular y NADPH, formándose N^G-hidroxi-L-arginina. Luego ocurre otra oxidación, requiriéndose de nuevo oxígeno molecular y NADPH para

eliminar electrones, insertar oxígeno y romper el enlace carbono-nitrógeno, formándose L-citrulina y óxido nítrico (Bugner, D., y col 1999).

Un rasgo característico de NOS2 es su ausencia de expresión en células estrictamente en reposo. Por lo tanto, su expresión es inducida por estímulos inmunológicos de una manera calcio independiente, lo cual guía a su designación original como óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La localización celular de la NOS2 ha sido principalmente investigada en macrófagos y neutrófilos, donde la NOS2 enzimáticamente activa puede ser detectada en el citosol, en pequeñas vesículas (aún no caracterizadas), en gránulos primarios y terciarios, en la vecindad de fagosomas presentando partículas inertes o patógenos avirulentos, unida al citoesqueleto de actina submembranal o en mitocondria. Hay evidencia en células no mieloides, del secuestro de NOS2 inactiva en cuerpos similares a los de inclusión citoplasmático perinuclear (agregosomas). Además, NOS2 ha sido descrita en el núcleo, pero el papel de NOS2 nuclear (y de otras isoformas de NOS) aún no está claro (Revisado en: Bogdan, C., 2015)

Adicionalmente a NOS2, hay dos otras dos isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS, NOS1) y NOS endotelial (eNOS, NOS3), originalmente llamadas de acuerdo a su distribución tisular predominante. Esas dos isoformas han sido también llamadas cNOS, porque a diferencia de NOS2, son constitutivamente expresadas y su actividad es dependiente de flujos de calcio que permiten la unión de calmodulina. Sin embargo, actualmente se reconoce que NOS1 y NOS3 presentan una amplia distribución celular y tisular, y que son reguladas por citocinas, productos microbianos, hormonas y factores micro-ambientales. NOS1 y NOS3 afectan la diferenciación y función de células

inmunitarias *in vitro* y modulan las respuestas inmunitarias y procesos inflamatorios *in vivo* (Revisado en: Bogdan, C., 2015).

REGULACION DE LA EXPRESIÓN DE NOS2

El gen que codifica para la enzima NOS2 se encuentra bajo control transcripcional por NF κ B, éste es inducido por polisacáridos bacterianos o citocinas pro-inflamatorias, como IL-1, IFN- γ y TNF- α , las dos última actuando en conjunto. En contraste con las otras dos enzimas constitutivas, NOS2 es capaz de producir grandes y sostenidas cantidades de NO en la célula (Coleman, J., 2002).

En el ratón, el sistema de los interferones [IFN- γ e IFN tipo I (IFN- α/β)] y patógenos o productos microbianos (por ejemplo, LPS) son inductores transcripcionales prototípicos del gen NOS2, los cuales estimulan eficazmente los macrófagos para la liberación de alta cantidades de NO. IFN y LPS provocan la dimerización de STAT1, la expresión del factor regulador de interferón (IRF) -1 y la formación del complejo factor 3 gamma estimulado por interferón (ISGF-3) (que consta de STAT1, STAT2 e IRF9), o la activación de NF- κ B, respectivamente, los cuales interactúan con los sitios de unión en la región promotora de NOS2. La investigación sobre NOS2 ha estado dominada por los estudios en ratón. Sin embargo, el análisis molecular de la expresión de NOS2 en otras especies es de gran relevancia para resolver las discusiones sobre el alcance y la importancia biológica de las diferencias específicas de las especies. Hoy en día, no hay duda de que las células humanas (por ejemplo, hepatocitos, macrófagos derivados de monocitos, células dendríticas, macrófagos tisulares) son capaces de expresar la proteína NOS2 y la actividad *in vitro* e *in vivo* de esta enzima. La caracterización de la expresión de NOS2 en células humanas ha

confirmado el papel crucial de la NF- κ B y STAT1 α , pero también ha revelado diferencias en la estructura del promotor (explicando la respuesta menor a IFN- γ y LPS), la importancia de los mecanismos post-transcripcionales, el impacto del origen celular, condiciones de cultivo y los estímulos. En los macrófagos alveolares humanos estimulados con IFN- γ más LPS, la falta de ARNm y de la expresión de la proteína NOS2 ha sido atribuido recientemente al silenciamiento génico epigenético por metilación CpG, modificaciones de las histonas, y compactación de la cromatina. Si bien estos resultados adicionales corroboran la menor respuesta de los macrófagos humanos a IFN- γ /LPS, estos contrastan fuertemente con la presencia de la proteína de NOS2 en macrófagos alveolares y granulomas de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, y de ninguna manera cuestionan la expresión de NOS2 por las células humanas (Revisado en: Bogdan, C., 2015). En los últimos años, varias citocinas inesperadas y factores de crecimiento han sido identificadas como (co) inductores de NOS2 en macrófagos. Macrófagos de ratón infectado con parásitos *Leishmania (L.) amazonensis* y estimulado con interleuquina (IL)-1 β liberan cantidades importantes de NO. Aproximadamente, el 40% de la producción de NO era dependiente de la activación del inflamasoma (caspasa 1) y la síntesis consecutiva de IFN- γ endógeno. Esto sugiere que la IL-1 β sí puede conferir señales inductoras de NOS2, confirmando hallazgos previos obtenidos con otros tipos de células de diferentes especies. En consonancia con esta observación *in vitro*, ratones infectados por *L. amazonensis* deficientes para la caspasa 1, los componentes respectivos del inflamasoma (es decir, NLRP3 y ASC) o el receptor de IL-1 (IL1R), desarrollaron lesiones cutáneas significativamente más graves que los controles de tipo silvestre. La IL-33, otro miembro de la familia de la IL-1 y el más conocido por su potente inducción de las respuestas de las

células T cooperadoras tipo 2 (Th2), desencadena la expresión de ARNm, de la proteína y la actividad de NOS2 en macrófagos de ratón (Revisado en: Bogdan, C., 2015).

Por otra parte, se ha descrito que la eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento clave para el desarrollo y la diferenciación de células sanguíneas rojas, inhibe la activación y la unión de NF- κ B p65 al promotor del gen *NOS2*, bloqueando en macrófagos la inducción de NOS2 y citoquinas pro-inflamatorias por ligandos microbianos unidos a receptores TLR, efecto compartido por la EPO con citocinas que desactivan a los macrófagos (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) (Revisado en: Bogdan, C., 2015).

Finalmente, se ha definido que los MicroRNAs (miRNAs) afectan la concentración de ARN mensajero de NOS2 y la expresión de la proteína en varios tipos celulares, incluyendo macrófagos de ratón, linfocitos esplénicos, células madre mesenquimales de ratón (MSC), células humanas endoteliales y hepatocitos. Sin embargo, en muchos casos los miRNAs identificados (por ejemplo: miR-125a-5p, miR-146a, miR-149, miR-155, miR-301a) actuaron indirectamente mediante el bloqueo de la expresión de señalización o factores de transcripción (por ejemplo: SOCS-1, IRAK-1, factor de represión de NF- κ B, factor 13 similar Krüppel, Rheb) que regulan positiva o negativamente la expresión del ARN mensajero de NOS2 (Revisado en: Bogdan, C., 2015). Una forma relacionada de la regulación NOS ha surgido a partir del descubrimiento de los transcritos antisentido no codificantes naturales (NATs) que derivan de la cadena de ADN opuesta (es decir, la hebra complementaria a la cadena codificante). NATs son generados por una gran proporción del genoma de mamíferos. En el caso de los genes NOS, los transcritos antisentido detectados o se originaron en el mismo locus del gen como contraparte sentido (cis-NAT) o de un

locus diferente (trans-NAT). Dependiendo de si los NATs interactúan con las regiones no traducidas o traducidas del ARNm, estabilizarán o regularán negativamente el ARNm de NOS2 o inhibirán la traducción del ARNm de NOS3 (Revisado en: Bogdan, C., 2015).

GEN *NOS2A*

La enzima NOS2 en humanos es codificada por el gen *NOS2A*, el cual se expresa en macrófagos infectados y en las células epiteliales (Revisado en: Kun, J., y col 2001). El gen *NOS2A* se encuentra en el cromosoma 17, está formado por 27 exones, con el sitio de inicio de transcripción en el exón 2 y el sitio de parada en el exón 27. La enzima NOS2 presenta dos dominios, un dominio reductasa y otro oxigenasa. Los exones del 1 al 13 del gen *NOS2A* codifican el dominio oxigenasa de la enzima y los exones del 14 al 27 codifican el dominio reductasa (Figura 3).



Figura 3. Representación esquemática del gen *NOS2A*. El gen consta de 1-27 exones. El codón de inicio en el exón 2 y el codón de parada en el exón 27. Los exones 1-13 codifican el dominio oxigenasa, los exones 14-27 codifican el dominio reductasa de la NOS2. Se observa el

polimorfismo C / T en el exón 16, este genera un cambio de aminoácido (posición 608: serina por leucina) (Qidwai, T., y Jamal, F., 2010)

POLIMORFISMO DE *NOS2A*

Luego de culminar el proyecto del genoma humano, los científicos se han concentrados en conocer las variaciones en la secuencia del ADN, en donde, el más común son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), es decir cambios de una base por otra en un solo nucleótido. Para que este tipo de mutación puntual sea considerado un SNP, debe tener una frecuencia del 1% en la población. Los SNP representan el 90% de toda la variación del genoma humano, se producen cada 100 a 300 bases a lo largo de 3 billones de bases del genoma. Muchos SNP no tienen efecto sobre la función celular, pero algunos SNP descritos influyen en la respuesta a enfermedades infecciosas, e inclusive, algunos influyen en la respuesta de células a drogas (Kim, B., y col., 2008)

Se ha descrito la existencia de diferentes polimorfismos en la región promotora del gen *NOS2A*, muchos de los cuales son polimorfismo de un solo nucleótido. Entre los polimorfismos SNP descritos en el gen *NOS2A* podemos señalar -954 G/C, -1026G/T, -1659C/T, -1173C/T. Además, en la región promotora de *NOS2A* se han descrito repeticiones en tándem o microsatélites: tetranucleótido (TAAA)_n y pentanucleótido (CCTTT)_n (Revisado en: Qidwai, T., y Jamal, F., 2010).

Los polimorfismos localizados en la región promotora afectan la unión de los factores de transcripción y, por ende, afecta la transcripción del gen, que puede ser incrementada o disminuida dependiendo de la afinidad de unión del factor de transcripción. La región promotora del gen *NOS2A*, contiene segmentos de ADN importantes para la unión del factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), la proteína activadora 1 (AP-1), el

activador de la transcripción proteína 1 (STAT1) y el factor de represión de NF- κ B. Por ejemplo, cercano a la región -954 se encuentran sitios de unión del factor NF- κ B (Figura 4) (Coia, V., y col 2005).

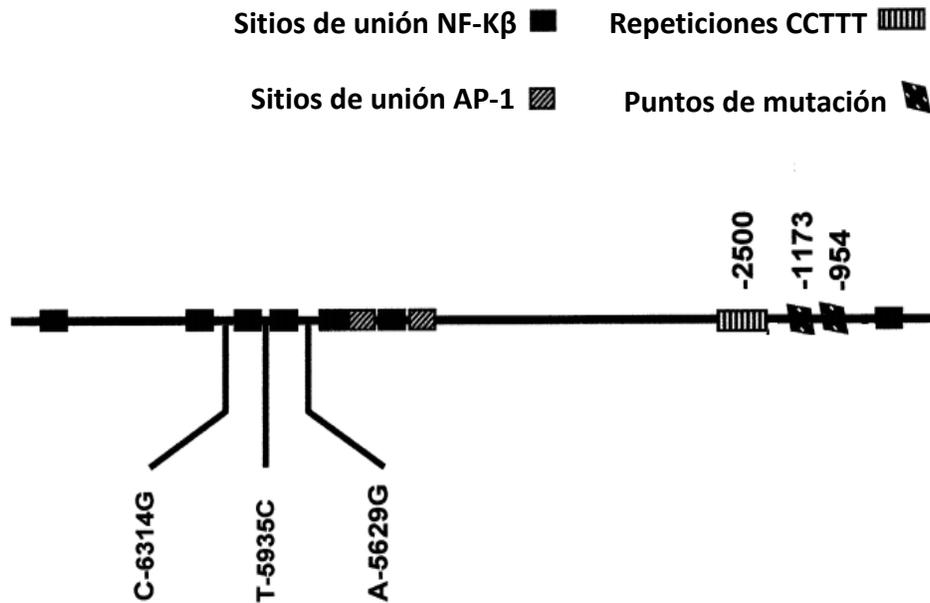


Figura 4. Representación esquemática de la región promotora del gen NOS2A. Se observan los sitios de unión del factor de transcripción NF- κ B y AP-1. Cerca del sitio -954 se encuentran sitios de unión del factor de transcripción NF- κ B (Coia, V., y col., 2005).

Consecuentemente, el cambio de base nucleotídica, una citosina por una guanidina, en el nucleótido en la posición -954, pudiese favorecer que el sitio de unión presente una mayor afinidad por el factor NF- κ B. Por lo tanto, esta mayor afinidad va a permitir que se transcriba más ARNm, que se puede traducir es una mayor expresión de proteínas, y por ende, una incrementada concentración de NO (Figura 5). Asimismo, los polimorfismos

localizados en región codificante pueden alterar la secuencia, estructura y/o función de la proteína relacionada, de la misma forma que los polimorfismo localizados en la región promotora, afectando las concentraciones de NO, incrementándolo o disminuyéndolo (Qidwai, T., y Jamal, F., 2010).

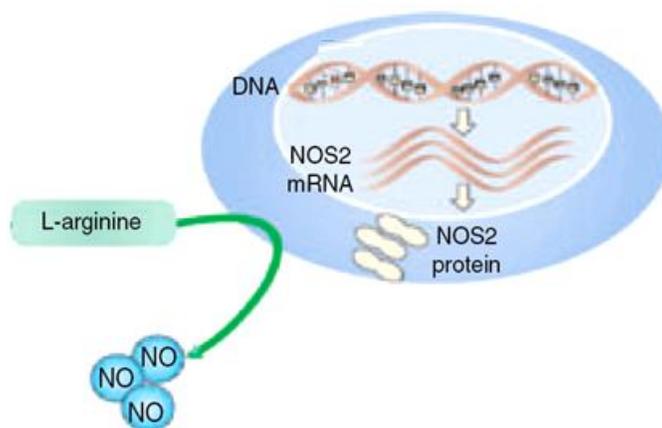


Figura 5. Representación esquemática de polimorfismo en la región promotora del gen. Mayor afinidad de unión del factor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ al ADN permite la traducción de mayor ARNm. Los polimorfismo en esta región permite que se transcriba más ARNm y, por ende, se traduzca más proteína, incrementando las concentraciones de NO (Qidwai, T., y Jamal, F., 2010)

Se ha descrito que las variaciones en la concentración de NO afecta la patogénesis de enfermedades infecciosas, tales como malaria, TB y Chagas (Revisado en: Qidwai, T., y Jamal, F., 2010). En la Tabla I se muestra el papel del polimorfismo de *NOS2A* en diferentes enfermedades infecciosas.

Tabla I. Papel del polimorfismo de *NOS2A* en diferentes enfermedades infecciosas.

Polimorfismo	Enfermedad	Población estudiada	Asociación	Autores
<i>(CCTTT)n</i>	Malaria	Gambia, África.	Un número ≥ 11 a repeticiones está asociado con la protección a malaria cerebral.	Burgner D. y col (1998)
<i>(CCTTT)n</i>	Chagas	Perú.	No se observaron asociaciones	J. E. Calzada y col (2002)
<i>(CCTTT)n</i>	TB	Paisa, Colombia.	Un número de 10 repeticiones está asociado con resistencia a la TB.	Gómez M. y col (2007)
<i>-954 G/C</i>	Chagas	Arequipa, Perú.	No se observaron asociaciones	Martin J. y col (1999)
<i>-954 G/C</i>	Malaria	Gabón, África.	Presencia del polimorfismo (alelo C) proporciona efecto protector contra re-infecciones de malaria.	Jürgen F. Kun y col. (2001)

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN INFECCIONES MICOBACTERIANAS

Los avances en la investigación de radicales libres han revelado que la producción, por las células inmunitarias innata, de oxígeno reactivo y especies de nitrógeno, tales como el superóxido (O_2^-) y óxido nítrico (NO), es un mecanismo de defensa del hospedero relativamente eficaz contra infecciones bacterianas, virales, parasitarias, y fúngicas. El NO es uno de los intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) con actividad antimicrobiana. El incremento en RNIs es mediado a través de nitrógeno reactivo con óxidos (por ejemplo, peroxinitrito: $ONOO^-$) generado por la reacción de NO con O_2 . El NO y RNIs pueden modificar el ADN, proteínas y lípidos del microorganismo y del hospedero. Además, el NO puede deaminar y dañar directamente el ADN bacteriano por generar sitios abásicos y roturas de la cadena. Otros posibles mecanismos de destrucción por NO incluyen

interacciones con dianas de proteínas accesorias, tales grupos hierro-azufre, grupos hemo, tioles, residuos fenólicos o aromáticos, radicales tirosilo y aminas. Esas reacciones resultan en inactivación enzimática y/o otras fallas de proteínas (Revisado en: Yang, CS., y col., 2009).

El NO y otros RNI pueden reaccionar con los elementos estructurales, componentes de la maquinaria de replicación, ácidos nucleicos, enzimas metabólicas, o con moléculas asociadas a la virulencia de patógenos infecciosos, que es la base para sus efectos antivirales o antimicrobianos directos. Aunque el óxido nítrico, probablemente, ataque al mismo tiempo múltiples estructuras de un patógeno infeccioso, la interrupción de una única estructura diana microbiana (por ejemplo, grupos [Fe-S]) puede ser suficiente para un fuerte efecto antimicrobiano. El control de los patógenos por el NO derivado de NOS2 no implica necesariamente su muerte y eliminación. De hecho, la reducción de la actividad metabólica microbiana mediada por NO causa un deterioro de la proliferación de patógenos *in vivo* y permite la resolución clínica de la enfermedad por la respuesta inmunitaria, como se ha demostrado para el parásito *L. major*. Aunque una translocación mejorada de NOS2 hacia una vacuola que contiene patógeno ha sido asociado con un mejor control de la infección *in vitro*, la localización de NOS2 en la proximidad inmediata a un microbio intracelular no es una condición sine qua non para la ejecución de su actividad antimicrobiana. La difusión transcelular de NO a partir de macrófagos no infectados, que expresan NOS2, a células del hospedero infectadas con *Leishmania* y negativas para NOS2 es también eficaz para matar el parásito *in vitro*, e incluso podría representar el escenario que prevalece *in vivo* durante infecciones aguda y latente. La detección de NOS2 en granulomas de seres humanos y macacos infectados con *M. tuberculosis* es también

indicativo de un papel antimicrobiano de NO durante la tuberculosis aguda y latente.

(Revisado en: Bogdan, C., y col., 2015)

ANTECEDENTES

PAPEL DE NO EN TUBERCULOSIS

En humanos existe controversia alrededor del papel del NO en la eliminación y la inhibición de *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha demostrado que la inhibición temprana del crecimiento de micobacterias en macrófagos alveolares humanos es NO independiente. Específicamente, el IFN- γ exógeno falla en producir efectos micobactericidas en macrófagos alveolares humanos. Sin embargo, un conjunto de evidencias sugieren que la producción de NO por monocitos /macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, líneas de células tipo macrófago y células epiteliales inducen una actividad mico-bacteriostática contra *Mycobacterium tuberculosis*. Por ejemplo, los macrófagos alveolares de sujetos sanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* producen NO, y esta producción se correlaciona con la inhibición intracelular del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Otro estudio demostró que al infectar con *Mycobacterium tuberculosis* células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con tuberculosis, la producción de NO era mayor en comparación con los controles sanos. Además, otros estudios también han demostrado que los macrófagos alveolares son capaces de eliminar micobacterias y que estas actividades anti-micobacterianas son dependientes de la expresión de NOS2. Estos resultados sugieren un papel significativo de NO en la defensa del hospedero contra infecciones micobacterianas. (Revisado en: Yang, CS., y col., 2009).

PAPEL DE NOS2 EN TUBERCULOSIS

La enzima NOS2 se expresa en macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis (Nicholson, S., y col, 1996). Jhon MacMicking y colaboradores, examinaron la hipótesis que *NOS2A* era un locus de protección fundamental contra la tuberculosis. Los autores emplearon ratones con genotipo *NOS2^{+/+}*, *NOS2^{+/-}* y *NOS2^{-/-}*, y los infectaron con el mismo número de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*. La ausencia del gen *NOS2* (*NOS2^{-/-}*) condujo a un rápido crecimiento bacteriano y la muerte del ratón, mientras que los ratones heterocigotos *NOS2^{+/-}* y homocigotos *NOS2^{+/+}* extendieron su supervivencia. Estos resultados demostraron que el locus *NOS2* es necesario para controlar la enfermedad de tuberculosis (MacMicking, J., D., y col., 1997).

PAPEL DEL POLIMORFISMO NOS2A-G954C EN TUBERCULOSIS

Un primer estudio sobre el papel del SNP *NOS2A-G954C* (rs1800482) en el desarrollo de la tuberculosis, realizado en Mestizos mexicanos de México D. F. (Distrito Federal), mostró la ausencia de asociación entre esta variante y la enfermedad (Flores-Villanueva, P., y col., 2005). Posteriormente, Möller y colaboradores (2009) investigaron una posible asociación de las variantes genéticas rs1800482 (*-G954C*), rs2779249, rs9282799, rs8078340 presentes en el gen *NOS2A* y susceptibilidad a tuberculosis en la población de color de Sudáfrica. En este estudio los SNP rs2779249 y rs8078340 estaban asociados con TB. Sin embargo, al corregir el valor de p se perdió la significancia. Además, los SNP rs1800482 y rs9282799 tampoco se asociaron con la enfermedad. En resumen, después de la corrección de los valores de p, ninguno de los SNPs *NOS2A* se asoció

individualmente con TB. Por lo tanto, realizaron el análisis de haplotipos de *NOS2A* y establecieron asociaciones con el desarrollo de TB. El estudio de desequilibrio de ligamiento entre los SNP de *NOS2A* mostró dos bloques de haplotipos (bloque 1 y bloque 2), donde cada bloque incluía cuatro haplotipos posibles, observándose en los controles y pacientes solo tres de los cuatro haplotipos en cada bloque (1 y 2). Los haplotipos del bloque 2 se caracterizaban por la presencia de los SNP funcionales rs9282799 y rs8078340 y los haplotipos del bloque 1 por la presencia de los SNP rs1800482 y rs9282799. Al establecer las asociaciones de estos haplotipos con el desarrollo de TB, se encontraron asociaciones significativas de dos de los haplotipos del bloque 2 con tuberculosis. Observándose, que la frecuencia de uno de los haplotipos estaba sobre-representado en los controles (confiriendo protección), mientras que el otro haplotipo presentaba una mayor frecuencia en los casos de tuberculosis (confiriendo susceptibilidad). Las asociaciones permanecieron significativas después de la prueba de permutación. Estos haplotipos asociados presentaban diferentes alelos (C o T) del SNP funcional rs8078340, con el alelo T presente en el haplotipo más frecuente en los casos de tuberculosis. Datos funcionales indican que la presencia del alelo T reduce tanto la cantidad de complejo proteico unido a esta región del ADN (que contiene sitios de unión de factores de transcripción), así como la duración de la interacción, por lo tanto, es posible que los individuos con este haplotipo transcriban menos el gen *NOS2A* y, consecuentemente, producen menos NO por cortos períodos, lo cual podría ser ventajoso para la bacteria (Möller M., y col., 2009).

En 2013, Leandro A.C. y colaboradores evaluaron la asociación entre el polimorfismo *NOS2A-G954C* y el padecimiento de tuberculosis en un grupo de pacientes de Río de Janeiro, Brasil. Además, de evaluar el polimorfismo en la población de estudio,

evaluaron las concentraciones de NO en suero de pacientes con tuberculosis, en busca de una relación entre el polimorfismo y la producción de NO. Los resultados de Leandro A.C. y colaboradores indicaron que no había asociación entre el polimorfismo *NOS2A-G954C* y el padecimiento de tuberculosis en el grupo estudiado y correlación entre las variantes de *NOS2A* y la producción de NO (Leandro, A., C., y col., 2013).

Tabla II. Polimorfismos del gen *NOS2A* en Tuberculosis.

Población	Tamaño de la Población	Polimorfismo	Asociación
Mestizos Mexicanos, México D.F., México.	435 pacientes 510 controles	-954 G/C	No hay asociación entre la variante y la TB.
Río de Janeiro, Brasil.	172 pacientes 179 controles	-954 G/C	No hay asociación entre la variante y la TB, además, no hay correlación entre la variante y la producción de NO.
Población de color, Sudáfrica.	278 pacientes 299 controles	-954 G/C	No hay asociación entre la variante y la TB.
		rs8078340	Hay asociación entre el alelo T y la susceptibilidad a padecer TB.

Considerando que la distribución de los polimorfismos genéticos pueden variar entre poblaciones, que los estudios en ratones y seres humanos indican que la enzima óxido nítrico sintasa inducible (*NOS2*) es una molécula que juega un papel importante en la respuesta inmunitaria a la TB y que la variabilidad del gen que la codifica puede afectar su transcripción, y por ende la concentración de NO, nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar el polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A* en pacientes con Tuberculosis pulmonar.

Objetivos específicos:

1. Determinar la distribución de los genotipos del gen *NOS2A* en individuos aparentemente sanos e infectados por *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Determinar las posibles asociaciones entre los genotipos y alelos del gen de *NOS2A* y susceptibilidad a desarrollar tuberculosis pulmonar.
3. Determinar la concentración de nitritos en plasma de individuos aparentemente sanos e individuos con TB pulmonar.
4. Determinar si existe correlación entre la presencia de genotipos del gen *NOS2A* (*G-954C*), las concentraciones de nitritos plasmáticos y tuberculosis pulmonar

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes con TB.

Se estudiaron 69 individuos venezolanos, no relacionados y con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, quienes acudieron al Servicio de Neumonología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal de Caracas entre marzo de 2005 y julio de 2006. Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a los criterios diagnósticos de la Norma Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis vigente, con exámenes de dos baciloscopias (BK) positivas, síntomas clínicos de TB y radiografía (Rx) de tórax consistente con la enfermedad activa (Figura 6).

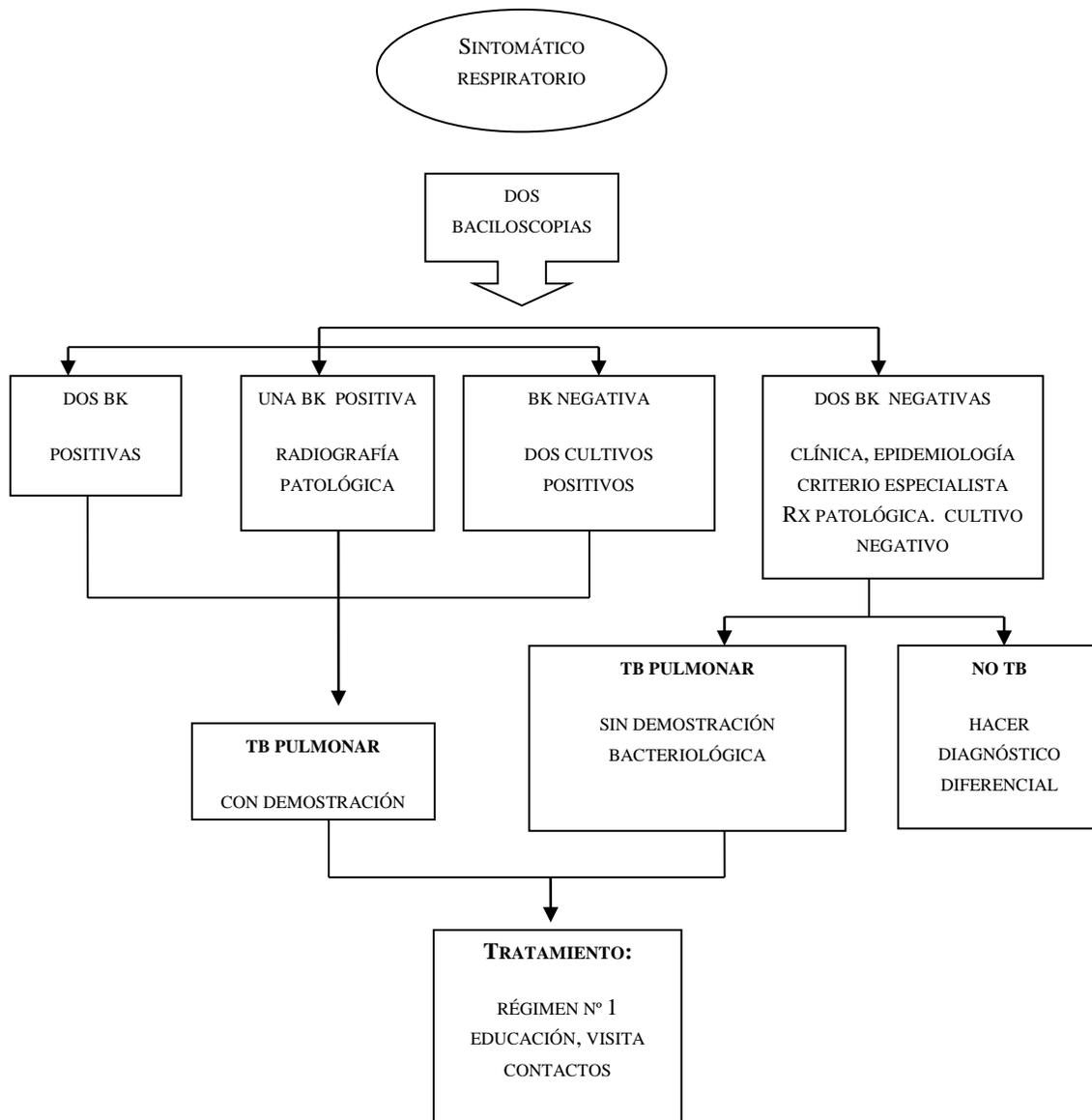


Figura 6. Diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Norma del Programa Nacional

Integrado de Control de la Tuberculosis. MSDS, 2005.

2. Selección del grupo control.

Se estudiaron 94 individuos venezolanos sanos, no relacionados, expuestos al bacilo. Este grupo incluyó voluntarios del personal que labora en el Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal de Caracas. De cada uno de estos individuos se obtuvo información sobre la prueba de tuberculina (PPD) para determinar aquellos que han estado en contacto con el bacilo. Estos individuos no presentaron síntomas de TB al momento de la toma de muestra de sangre.

Previo a la recolección de muestras del grupo control y del grupo pacientes, se les solicitó la firma del consentimiento informado. Este consentimiento informado fue aprobado previamente por los Comités de Bioética del IVIC y del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal de Caracas (ver Anexos). De cada uno de los pacientes se obtuvo la siguiente información: edad, grupo étnico, región de origen, procedencia, nivel educacional, hábitos tabáquicos y alcohólicos, dieta, ejercicio, exposición previa a TB por individuos infectados, inmunización con BCG y la prueba PPD (ver Anexos).

En el estudio se excluyeron aquellos individuos que presentaban enfermedades asociadas, tales como: diabetes, cáncer, silicosis, SIDA, VIH positivo, tratamiento con cortico-esteroides y condiciones asociadas como embarazo, pero se incluyeron aquellos que habían o no recibido previamente tratamiento antituberculoso.

3. Extracción de ADN genómico.

El ADN genómico se obtuvo a partir de 10 mL de sangre periférica utilizando EDTA como anticoagulante y fue extraído por el Dr. Ángel Villasmil empleando el método con solvente orgánico (Bunce, M., 2000). El procedimiento fue el siguiente:

La muestra de sangre periférica con anticoagulante se centrifuga por 10 minutos a 1000 g para obtener los leucocitos (capa blanca), estos son lavados con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB, red cell lysing buffer), se agita por inversión. Luego se centrifuga de nuevo por 10 minutos a 1000 g, se descarta el sobrenadante y se repite el lavado con RCLB hasta que el precipitado de leucocitos quede blanco.

El precipitado se resuspende en 3 mL de buffer de lisis nuclear (NLB, nuclear lysing buffer) y se deja en baño a 56⁰C hasta que se disuelva el precipitado. Una vez disuelto, se añade 1 mL de cloruro de sodio (NaCL 5,25 M), se agita en vortex, se añade 2 mL de cloroformo, se vuelve agitar hasta formar una solución lechosa, se centrifuga por 20 minutos a 1000g. Luego se aspira el ADN (fase acuosa) y se transfiere a un tubo de polipropileno.

A la fase acuosa se le añade 2 volúmenes de etanol 95% frío, se rota el tubo hasta que el ADN precipite, se atrapa la malla de ADN con una pipeta de polipropileno y se traspasa a un tubo de 1,5 mL estéril. El ADN se lava con etanol 70% y se centrifuga por 5 minutos a máxima velocidad, se retira el etanol. Finalmente se resuspende el ADN en buffer EE (Epps-EDTA).

4. Ajuste del ADN.

La concentración de ADN se obtuvo mediante lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260nm y a 280nm de cada muestra (2 µL), utilizando un nanodrop (NanoDrop™ 2000).

La concentración del ADN (µg/mL) viene dada por la fórmula:

$$[\text{ADN}]_{\text{ds}} = 50 \mu\text{g} / \text{mL} (\text{factor constante}) \times \text{DO } 260\text{nm}.$$

1DO260nm = 50 µg de ADN/mL

Se calculó el índice = DO260nm / DO280nm (Este debe ser mayor de 1,7) y se ajustó la concentración de [ADN] a 200µg/mL.

5. Calidad del ADN.

Se evaluó si las muestras de ADN extraídas no estaban degradadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,75% en TBE 1X, visualizado con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). En cada pozo del gel se colocó 5 µL de buffer de carga con 5 µL de ADN. En uno de los pozos del gel se colocó, como control, 5 µL del fago lambda ajustado a 200 µg/mL (Promega) sin digerir. Se dejó correr a 100 voltios por 30 min.

6. Método para el análisis del polimorfismo.

Para el análisis del polimorfismo -954 G/C del gen *NOS2* se utilizó la técnica PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción). Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción reconocen y digieren secuencias de ADN obtenidas por PCR, en sitios específicos, originando fragmentos de distintas longitudes asociados al polimorfismo existente, es decir, originando patrones de digestión distintos (Arens, M., 2001)

6.1. PCR-RFLP del polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A*.

Para el análisis del polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A* se emplearon los iniciadores (Tabla III) y protocolo de amplificación descrito por Jürgen Kun y colaboradores (Kun, J., y col., 2001).

Tabla III. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de *NOS2A-954G/C* y el tamaño del producto amplificado.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>NOS2A-954G/C</i>	Sentido	CAT ATG TAT GGG AAT ACT GTA TTT CAG	574
	Antisentido	TCT GAA CTA GTC ACT TGA GG	

La amplificación se realizó en un termociclador empleando la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1X, 0,5 pmol de cada iniciador (sentido y Antisentido, 0,8 mM de dNTPs, 1,5Mm de MgCl₂, 1 U de la enzima Taq polimerasa Go Taq (Promega) y agua destilada hasta completar un volumen final de 18 µL. Se utilizó 2 µL de muestra de ADN genómico (200 µg/mL), para un volumen total de reacción de 20 µL.

La reacción de amplificación consistió de un ciclo de desnaturalización del ADN a 94 °C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 60 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 7 minutos.

El producto de PCR de 574 pb se verificó en geles de agarosa al 1,5% (Sigma), visualizados con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida se realizó a 100 voltios por 45 minutos. Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Promega BenchTop 100bp DNA Ladder).

El producto amplificado fue digerido con la enzima de restricción BsaI (New England Biolabs), cuyo sitio de reconocimiento es 5'...GGTCTC...3' y 3'...CCAGAG...5'.

El protocolo de digestión fue el siguiente: Buffer NEB3 1X, 1 U de la enzima de digestión BsaI y agua destilada hasta completar un volumen de final de 9 µL. Se utilizó 6 µL del producto amplificado, para un volumen total de reacción de 15 µL y se incubó a 51°C por 16 horas.

El producto amplificado al ser sometido a digestión con la enzima de restricción generó tres bandas 574 pb, 446 pb y 128 pb correspondiente al genotipo heterocigoto CG, dos bandas de 446 pb y 128 pb para el genotipo homocigoto silvestre GG y una banda de 574 para el genotipo homocigoto mutado CC (Tabla IV). Los productos de la digestión se visualizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 1,5%, se empleó bromuro de etidio.

Tabla IV. Patrón de digestión para la asignación de los genotipos del SNP -954G/C NOS2A.

Genotipo	Número de bandas obtenidas después de la digestión con la enzima de restricción.	Tamaño de los Fragmentos de ADN producidos.
CC	1 banda	574 pb
GC	3 bandas	574 pb 446 pb 128 pb
GG	2 bandas	446 pb 128 pb

7. Determinación de las concentraciones de nitrito.

Para determinar las concentraciones de nitrito en plasma se empleó el ensayo de Griess. El ensayo de Griess fue descrito por Johann Peter Griess en 1879 como un método de análisis de nitrito (NO_2^-) (Tsikas, D., y col., 2007). El nitrito es el producto estable de la auto-oxidación de óxido nítrico (NO) en solución acuosa, por lo tanto, la medición de las concentraciones de nitrito en plasma proporciona una estimación fiable y cuantitativa de la producción de NO *in vivo* (Miranda, K., y col., 2001). Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de nitritos, los cuales son los productos finales de la oxidación biológica de las aminas así como de la reducción de nitratos. En conjunto, tanto los nitritos como los nitratos han sido utilizados como indicadores de la producción de óxido nítrico debido a que ellos son los productos de degradación del mismo y tienen una mayor estabilidad que su precursor. En este método, todos los nitratos son reducidos a nitritos por el cadmio activado. Luego la sulfanilamida y el nitrito se unen para formar un cromóforo, que al acomplejarse con la amina bicíclica naftiletilendiamina forman un producto visible a 540 nm, que con la correspondiente curva standard permitió conocer las concentraciones de nitritos presentes en la muestra en estudio.

Tomando en cuenta que los metabolitos determinados a través de esta técnica son los nitritos, se utilizan dos curvas estándar, una que utiliza directamente nitritos (NaNO_2) (tabla V), y la otra que utiliza nitratos (KNO_3) (tabla VI), la cual es sometida a los mismos procedimientos que la muestra.

Tabla V. Curva estándar NaNO₂

Estándar (μM)	Patrón 1 mM (μL)	Agua desionizada (μL). Hasta completar un volumen final de 1000 μL
0	0	1000
5	5	995
10	10	990
25	25	975
50	50	950
100	100	900

Tabla VI. Curva estándar KNO₃

Estándar (μM)	Patrón 1 mM (μL)	Buffer glicina NaOH (μL)	Agua desionizada (μL). Hasta completar un volumen final de 1000 μL
0	0	100	900
5	5	100	895
10	10	100	890
25	25	100	875
50	50	100	850
100	100	100	800

Procedimiento

1.- Activación del cadmio.

Los gránulos de cadmio, almacenados hasta su uso en una solución de H_2SO_4 0,1 M, se activaron mediante el siguiente procedimiento:

Se descartó el ácido sulfúrico en el que se encontraba almacenado el cadmio, se lavó con agua desionizada por 2 veces y se incubó con 5 mL de CuSO_4 5 mM. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con buffer glicina-NaOH, se descartó el buffer y se utilizó el cadmio activado en los siguientes 10 minutos. Una vez utilizado se lavó con H_2SO_4 0,1 M, se descartó el ácido y se almacenó en H_2SO_4 0,1 M preparado en el momento.

2.- Deproteinización del suero

A 50 μL de suero se añadieron 200 μL de ZnSO_4 75 mM y luego 250 μL de NaOH 55 mM. Luego de mezclar con vortex, se centrifugó en microcentrífuga a 8100 g durante 5 minutos, siendo utilizado el sobrenadante obtenido para la determinación de nitritos.

3.-Determinación de nitritos.

A 150 μL del sobrenadante, se le colocaron 3 gránulos de cadmio activado (250 – 300 mg) y 6 gránulos en los tubos correspondientes a la curva standard de KNO_3 (se utilizó 1 mL de cada patrón). Se mezcló durante 20 minutos luego de los cuales se centrifugó a 8100 g durante 5 minutos, para precipitar los gránulos de cadmio y cualquier sustancia particulada producida durante la reacción. Se colocaron 100 μL del sobrenadante obtenido en placas de 96 pozos a los que se añadieron 50 μL de sulfanilamida 58 mM y 50 μL de

naftiletildiamina 0,76 mM, leyéndose la absorbancia a 540 nm a los 10 minutos de colocado el último reactivo.

Valores de referencia: 15-100 μ moles/L (Cortas, N., y col., 1990).

8. Análisis estadísticos.

8.1 Frecuencias alélicas y genotípicas.

Las frecuencias alélicas (FA) para cada gen, fueron obtenidas por contaje directo a partir de los alelos asignados a cada individuo. Se determinó el número de veces que se observa el alelo y se dividió entre dos veces el número total de individuos estudiados (N).

$$FA = \frac{\text{n}^\circ \text{ veces que se observa el alelo}}{2N}$$

Las frecuencias genotípicas para cada gen, fueron obtenidas por contaje directo a partir de los genotipos asignados a cada individuo. Se determinó el número de veces que se observa el genotipo, dicho valor se dividió entre el número total de individuos estudiados (N).

$$FG = \frac{\text{n}^\circ \text{ veces que se observa el genotipo}}{N}$$

8.2. Equilibrio Hardy-Weinberg.

Se realizó la prueba de equilibrio para la distribución genotípica en el grupo control y el grupo pacientes de acuerdo a Hardy-Weinberg (H-W). Se usó el programa OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies (Rodriguez, S., y col., 2009). La significancia (p) del desequilibrio de los genotipos se calculó con la prueba de χ^2 de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2 / E$$

Donde O es el valor de las frecuencias observadas y E el valor de las frecuencias esperadas. La significancia (p) del mismo se buscó en la tabla de χ^2 con 1 grado de libertad.).

La asociación del alelo o genotipo con enfermedad de TB, se estimó de acuerdo a los postulados de Woolf y Haldane, calculando, a partir de tablas de contingencia 2x2, la relación de probabilidades (OR, odds ratio) (Woolf, B., 1955). La significancia estadística se determinó por la prueba exacta de Fisher y por distribuciones χ^2 cuadrado de Mantel-Hanszel (Lison L., 1976)

El OR es usado para estimar el riesgo en estudios caso-control en los cuales los cálculos de riesgo relativo no son apropiados. Un OR < 1 indica protección, mientras un OR >1 indica un riesgo incrementado. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

1. Características del grupo de pacientes

De los 69 individuos con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, 35 individuos (50,7%) eran de sexo masculino y 34 individuos (49,3%) de sexo femenino. El promedio de edad de todos los pacientes fue de 37,81 años, siendo la edad mínima 17 años y la máxima 70 años de edad.

2. Características del grupo control

De los 94 individuos aparentemente sanos, 23 individuos (24,5%) eran de sexo masculino y 71 individuos (75,5%) de sexo femenino. El promedio de edad fue de 40,6 años, siendo la edad mínima 18 años y la máxima 55 años de edad. Al agrupar a los individuos aparentemente sanos de acuerdo a la prueba de tuberculina (PPD): 43 (45,7%) individuos eran PPD positivos, 18 (19,2%) PPD negativos y 33 (35,1%) no tenían información sobre esta prueba. Cabe destacar que ninguno de estos individuos presentó síntomas de TB al momento de la toma de muestra de sangre.

3. Calidad del ADN

Una vez ajustada la concentración del ADN a 200 µg/mL, se visualizó en geles de agarosa al 0,75% y se utilizó bromuro de etidio para la detección del ADN en el gel. Esto nos permitió confirmar si el ADN estaba ajustado a la concentración deseada al compararlo con un patrón ajustado a 200µg/mL (fago lambda), además, nos permitió evidenciar que el ADN genómico obtenido de las muestras de sangre periférica no estaba degradado (Figura 7).

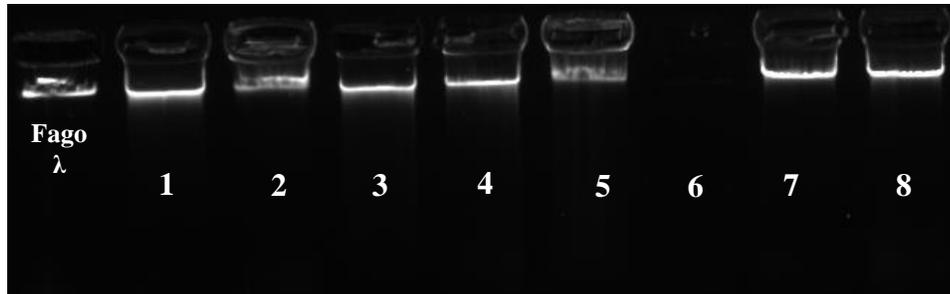


Figura 7. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X. Observamos el ADN genómico (bolsillos 1-5, 7-8) correspondientes a muestras de ADN de individuos incluidos en el estudio, así como el fago lambda ajustado a 200 µg/ml (marcador de referencia). Las muestras en donde no se observaba ADN (bolsillo 6) eran descartadas del estudio.

4. Amplificación de la región del gen *NOS2A* con la variante -954G/C

En la Figura 8 se muestra el producto amplificado correspondiente a la región del gen *NOS2A* que posee el polimorfismo -954G/C. El tamaño del producto amplificado fue de 574 pares de bases.

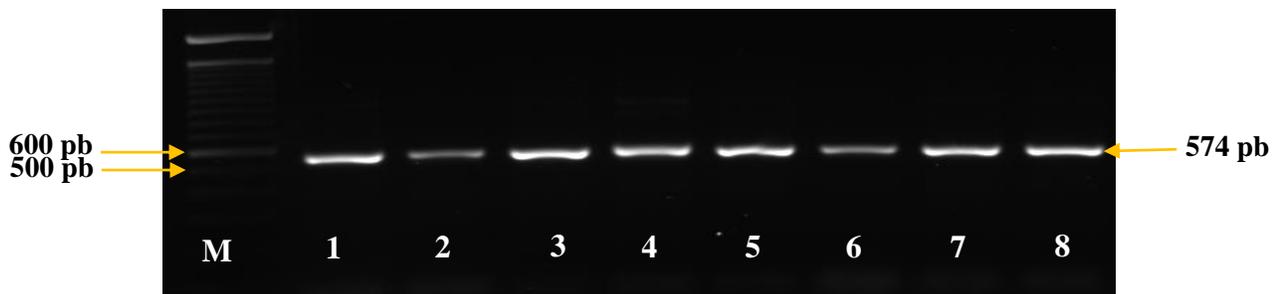


Figura 8. Visualización del producto amplificado del gen *NOS2A* en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X. Se observa el marcador de peso molecular (M) de 100 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los bolsillos 1 al 8 corresponden a muestras de pacientes donde se muestra la banda de 574 pb correspondiente al fragmento de ADN del gen *NOS2A*.

5. Digestión del producto amplificado

El producto amplificado de 574 pb se sometió a digestión con la enzima *BsaI*, observándose el siguiente patrón de bandas: dos bandas (una de 128pb y otra de 446 pb) correspondiente al genotipo GG, tres bandas (una de 128, una de 428 pb y otra de 574 pb) correspondiente al genotipo CG. No se observó el genotipo CC, representado por una banda de 574 pb (Figura 9).

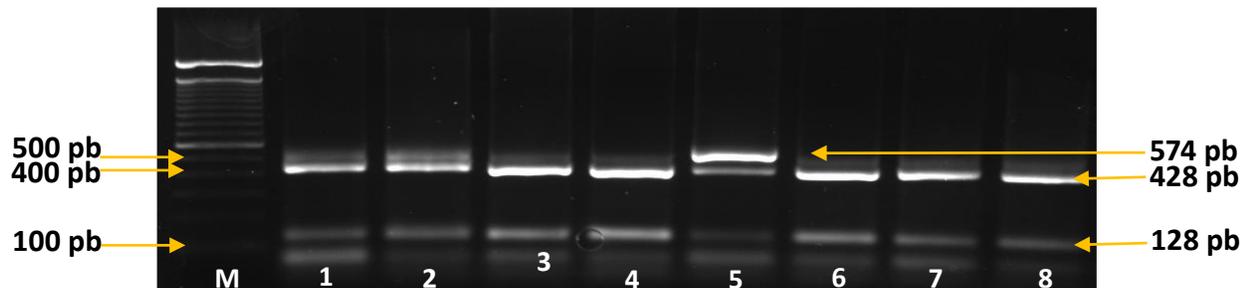


Figura 9. Visualización de los productos obtenidos de la digestión del producto amplificado de 574 pb del gen *NOS2A* con la enzima *BsaI*, mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X. Se observa al marcador de peso molecular (M) de 100 pb (Invitrogen) y los bolsillos del 1-2 y 5 corresponden a las muestras de pacientes con genotipo GG y los bolsillos del 3-4 y 6-8 a las muestras de pacientes con genotipo GC.

6. Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) para la distribución genotípica del polimorfismo -954 G/C del gen *NOS2A* en individuos aparentemente sanos y pacientes con TB.

La prueba de H-W se estimó para el marcador bialélico *NOS2A*-954 G/C en pacientes y el grupo control. Se pudo constatar la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución genotípica del sitio polimórfico -954 G/C del gen *NOS2A* en los dos grupos

estudiados, es decir no existe diferencias en la frecuencia esperada y observada para cada genotipo (GG y GC) (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg para los grupos control y pacientes.

	Genotipo	Esperado	Observado
Pacientes	GG	55.74	55
Controles		80.52	80
Pacientes	GC	12,58	14
Controles		12.96	14
Pacientes	CC	0,7	0
Controles		0,52	0

Pacientes: $X^2 = 0.86$, $p = 0.3483$.

Controles: $X^2 = 0.61$, $p = 0.4353$.

($X^2 = \text{Ji cuadrado}$, $p = \text{significancia}$).

7. Distribución de la frecuencias alélicas y genotípicas del gen NOS2A en individuos sanos y pacientes con TB.

Al analizar el polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A* en pacientes con TB y controles observamos solo dos (GG y GC) de los tres genotipos posibles. Tanto en pacientes con TB, como en el grupo control, el genotipo GG presentó la mayor frecuencia (80% y 85%, respectivamente), seguido por el genotipo GC (20% y 15%, respectivamente). Asimismo, observamos en ambos grupos estudiados que el alelo G presentó una mayor frecuencia (90% en pacientes y 93% en controles) y el alelo C una frecuencia disminuida (10% en pacientes y 7% en controles) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A* en el grupo control y pacientes TB.

	Pacientes n=69	Controles n=94
Genotipo		
GG	80 (55)	85 (80)
CG	20 (14)	15 (14)
Alelo		
G	90 (124)	93 (174)
C	10 (14)	7 (14)

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje

8. Comparación de frecuencias de los genotipos y alelos del polimorfismo -954G/C del gen *NOS2A* entre el grupo de pacientes con TB y controles

Al establecer las comparaciones de frecuencias genotípicas entre los pacientes e individuos sanos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, para investigar la posible influencia de las variantes -954G/C del gen *NOS2A* en el desarrollo de la tuberculosis, comparamos las frecuencias alélicas y genotípicas entre los diferentes grupos: pacientes TB vs. controles PPD positivos, pacientes TB vs. controles PPD negativos y controles PPD positivos vs. controles PPD negativos.

Tabla IX. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -954G/C del gen NOS2A entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD

	Pacientes n=69	Controles n=94	Controles PPD + n=43	Controles PPD - n=18
Genotipo				
GG	80 (55)	85 (84)	91(39)	88.9(16)
CG	20 (14)	15 (14)	9(4)	11.1(2)

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje

Como se puede observar en la Tabla X, al comparar las frecuencias genotípicas, no se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles agrupados en PPD positivos y negativos. Asimismo, no se observaron diferencias de frecuencias genotípicas al establecer comparaciones entre los controles (PPD + vs. PPD -).

Tabla X. Comparaciones de frecuencias genóticas del polimorfismo -954G/C del gen NOS2A entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD

	OR (IC 95%)	P
<i>Pacientes vs Controles</i>		
GG	0,68	0,18
GC	1,45	0,18
<i>Pacientes vs Controles PPD+</i>		
GG	0,40	0,06
GC	2,48	0,06
<i>Pacientes vs Controles PPD-</i>		
GG	0,49	0,18
GC	2,03	0,18
<i>Controles PPD+ vs Controles PPD-</i>		
GG	1,21	0,41
GC	0,82	0,41

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio; IC 95%: Intervalo de confianza de 95%, p: valores de p, p<0.05: no significativo.

Igualmente, al realizar comparaciones de las frecuencias alélicas entre los diferentes grupos: pacientes TB vs. controles totales, pacientes TB vs. controles PPD positivos, pacientes TB vs. controles PPD negativos y controles PPD positivos vs. controles PPD negativos, no se observaron diferencias significativas. (Tabla XI y XII, respectivamente).

Tabla XI. Frecuencias alélicas del polimorfismo -954G/C del gen NOS2A entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD

	Pacientes n=69	Controles n=94	Controles PPD + n=43	Controles PPD – n=18
Alelo				
G	90 (124)	93 (174)	95.3(82)	94.4(34)
C	10 (14)	7 (14)	4.7(4)	5.6(2)

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje

Tabla XII. Comparaciones de frecuencias alélicas del polimorfismo -954G/C del gen NOS2A entre el grupo pacientes con TB y controles agrupados de acuerdo a la prueba PPD

	OR (IC 95%)	P
<i>Pacientes vs Control</i>		
G	0,71	0,19
C	1,4	0,19
<i>Pacientes vs Controles PPD+</i>		
G	0,43	0,07
C	2,31	0,07
<i>Pacientes vs Controles PPD-</i>		
G	0,52	0,2
C	1,92	0,2
<i>Controles PPD+ vs Controles PPD-</i>		
G	1,21	0,42

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio; IC 95%: Intervalo de confianza de 95%, p: valores de p, $p < 0.05$: no

9. Concentraciones de nitritos en sueros de pacientes con TB e individuos sanos

La concentración de nitritos se determinó en 45 pacientes y 75 controles, ya que no disponíamos de los plasmas de todos los pacientes y controles incluidos en el estudio. Al usar una curva que directamente utilizaba nitritos (NaNO_2) y la otra que utilizaba nitratos (KNO_3) se logró comprobar, que a través de la técnica utilizada, se estaban cuantificando los nitritos, y que además, los nitratos presentes en la muestra eran transformados a nitritos, ya que al comparar ambas curvas estándar no hubo resultados estadísticamente diferentes.

Al determinar las concentraciones de óxido nítrico en sueros de pacientes con TB ($n=45$) e individuos sanos ($n=75$), observamos una concentración significativamente incrementada de nitritos en los sueros de controles con respecto a los sueros de pacientes ($p=0,0001$). La media de la concentración de nitritos en pacientes fue de $8,431 \pm 1.447 \mu\text{M}$ y la de controles de $20,95 \pm 1.415 \mu\text{M}$, demostrando que la producción de óxido nítrico (nitritos) fue mayor en los controles con respecto a los pacientes (**Figura 10**).

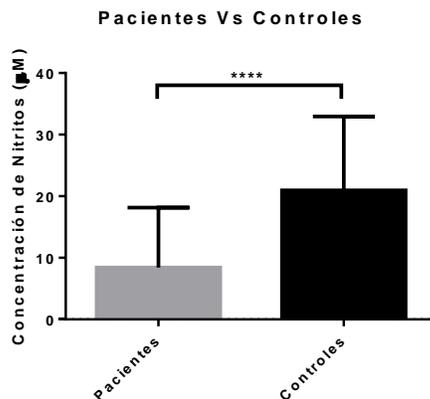


Figura 10. Concentraciones de nitritos en sueros de pacientes (n=45) y controles (n=75). La concentración media de nitritos en pacientes es de 8.431 ± 1.447 μM y la de los controles 20.95 ± 1.415 μM .

Al realizar comparaciones de las concentraciones de nitritos entre el grupo de pacientes y el grupo control PPD positivo observamos una diferencia significativa en la concentración de este metabolito ($p=0,0001$). La concentración media de nitritos en pacientes fue de $8,431 \pm 1.447$ μM y la del grupo control PPD+ fue de $20,97 \pm 1.808$ μM . Estos resultados sugieren que los individuos que han estado en contacto con *Mycobacterium tuberculosis* y que no desarrollan tuberculosis (grupo control PPD+) producen altas concentraciones de óxido nítrico (Figura 11).

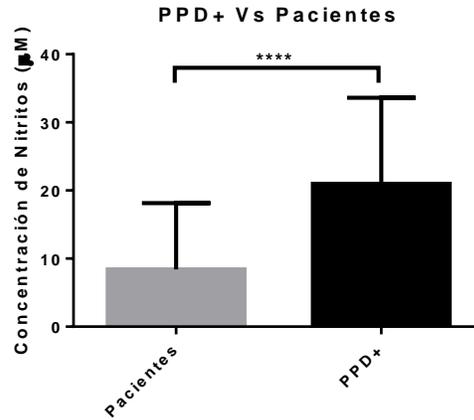


Figura 11. Concentraciones de nitritos en sueros de Pacientes (n=45) y controles PPD positivos (n=75). La concentración media de nitritos en pacientes es de $8.431 \pm 1.447 \mu\text{M}$ y la de los controles PPD positivos (n=49): $20.97 \pm 1.808 \mu\text{M}$. $p=0.0001$.

Finalmente, no se realizaron comparaciones de las concentraciones de nitritos entre pacientes con TB versus controles PPD negativo, y entre controles PPD positivos versus controles PPD negativos, porque solo teníamos los plasmas de dos controles PPD negativos.

10. Correlaciones entre concentraciones de nitritos y genotipos -954G/C del gen NOS2A en pacientes con tuberculosis

Al realizar las correlaciones de las concentraciones de nitritos con el genotipo en los pacientes con tuberculosis no observamos una diferencia significativa entre los distintos genotipos (GG y GC) y la concentración de este metabolito ($p=0.06$). La

concentración media de nitritos en pacientes con el genotipo GG (n=34) fue de $6.878 \pm 1.192 \mu\text{M}$ y en el grupo de pacientes con el genotipo GC (n=11) fue de $13.23 \pm 4.488 \mu\text{M}$. Estos resultados sugieren que no hay una correlación entre los genotipos de la variante *NOS2A-G954C* y las concentraciones de nitritos plasmáticos en pacientes con TB pulmonar.

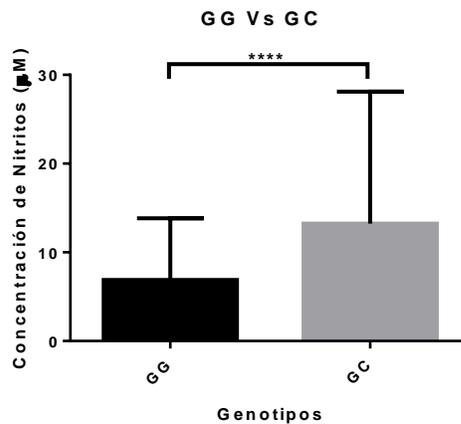


Figura 12. Concentraciones de nitritos en suero de pacientes con distinto genotipo *NOS2A-G954C*. La concentración media de nitritos pacientes con el genotipo GG ((n=34) fue de $6.878 \pm 1.192 \mu\text{M}$ y en el grupo de pacientes con el genotipo GC (n=11) fue de $13.23 \pm 4.488 \mu\text{M}$. $p= 0.06$.

DISCUSIÓN

La TB es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. En respuesta a la entrada del bacilo, los macrófagos alveolares producen NO (molécula antimicrobiana) inducido por el IFN- γ , producido por las células T CD4⁺ que reconocen a los macrófagos infectados, y por el TNF- α , producido por los macrófagos al reconocer los PAMPs ubicados en la pared celular del bacilo. Por ende, el NO es una molécula que juega un papel importante en la respuesta a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Revisado en: Ahmad, S., 2010).

Desde el descubrimiento del genoma humano, muchas investigaciones se han centrado en el estudio de polimorfismo en genes que participan en la respuesta a enfermedades infecciosas, como el estudio del polimorfismo de genes que codifican citocinas, como TNF- α , IFN- γ , o moléculas más simples que participan en la respuesta inmunitaria, como el NO (Qidwai, T., y Jamal, F., 2010).

Jürgen F. Kun y colaboradores en el 2001 realizaron un estudio en Gabón (África), donde evaluaron el polimorfismo *NOS2A-G954C* en pacientes con Malaria. Estos autores encontraron que la presencia del alelo C en los pacientes impedía la reinfección con *Plasmodium* (Kun, J., y col., 2001). Estos resultados demostraron que la alta producción de NO, debido a la alta afinidad de unión del factor de transcripción NF-k β al sitio -954 C, proporcionaba protección (Coia, V., y col 2005; Kun, J., y col., 2001). No obstante, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre los pacientes con TB y el grupo control (grupo total, controles PPD +, controles PPD -), en concordancia con el estudio realizado en México (Flores-

Villanueva y col, 2005), Sudáfrica (Möller y col, 2009) y Brasil (Leandro A. C. col, 2013), en los cuales no se observó una asociación entre el polimorfismo *NOS2A-G954C* y susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis* y el desarrollo de TB.

Es importante resaltar que en la región promotora del gen *NOS2A* no solo se encuentra el SNP *-954G/C*, sino que existen otros polimorfismos, como los SNP *-1173C/T* y *-1659A/T*, los cuales han sido asociados con variaciones en la concentración de NO (Qidwai, T., y Jamal, F., 2010) (Figura 13).

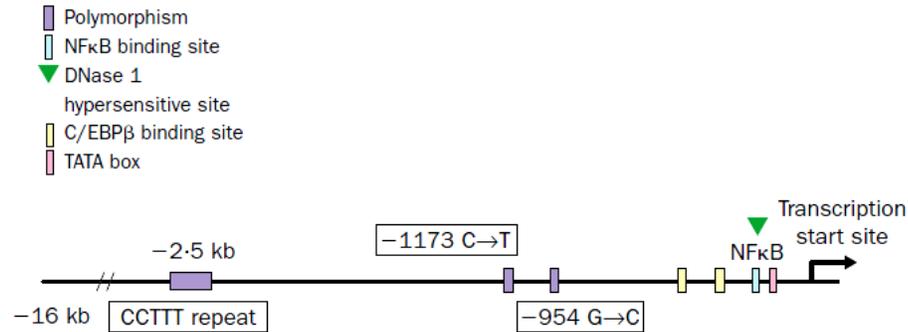


Figura 13. Diagrama esquemático de las primeras 2500 pb de la región promotora del gen NOS2A. Se muestran las posiciones de las variantes (CCTTT)_n, -1173 C/T y -954G/C, con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Además, se muestra la caja TATA, y los sitios de unión para las proteínas de unión al ADN (NF-κβ y C/EBPβ) y un sitio hipersensible a DNAsa (Hobbs, R., y col., 2002).

El polimorfismo *-1173 C/T* localizado en la región promotora produce una fuerte inducción de la transcripción de *NOS2* en el ratón, pero en humanos solamente induce la transcripción basal del gen *NOS2*. El cambio de C por T predice la creación de un nuevo

sitio de reconocimiento para los factores de transcripción GATA-1 o GATA-2. Estas proteínas se unen a secuencias específicas del ADN y afectan la transcripción del ARN mensajero a partir del ADN y puede potencialmente explicar el mayor grado de transcripción del promotor -1173 C/T. Sin embargo, ni GATA-1 ni GATA-2 se unen a secuencias silvestres o secuencias con la variante -1173 C en ensayos de cambio en la corrida electroforética (gel shift). Consecuentemente, la unión GATA-1 o GATA-2, posiblemente, no sea el mecanismo a través del cual se incrementa la producción de NO, por lo tanto, una hipótesis alternativa es que este polimorfismo altera la unión de un represor de transcripción en este sitio (Hobbs, R., y col., 2002). Por otra parte, se ha descrito que la presencia del alelo T en el SNP funcional rs8078340, reduce la unión de complejos proteicos (factores de transcripción) a esta región del ADN, así como la duración de la interacción factor de transcripción-ADN, por lo tanto es posible que la presencia de este alelo induzca una menor transcripción del gen *NOS2A* y, consecuentemente, una menor producción de NO (Möller M., y col., 2009). Asimismo, otra variante que pudiera estar afectando las concentraciones de NO son las repeticiones del microsatélite (CCTTT)_n. Ensayos de promotor del gen *NOS2A* han demostrado que la actividad del mismo incrementa en paralelo con el número de repeticiones (CCTTT)_n en células HaCaT (línea de queratinocito humana) (Ryk, C., y col., 2014).

Por lo tanto, es recomendable estudiar un gran número de SNP de un mismo gen (*NOS2A*) y establecer las asociaciones con las combinaciones genotípicas y/o haplotípicas, ya que estas variantes se encuentran en desequilibrio de ligamiento, abarcando así las variantes con efectos funcionales, las cuales explicarían el posible papel de ese gen en la condición de estudio.

En relación a la concentración de nitritos, en nuestro estudio observamos diferencias en la concentración de nitritos de sueros de controles y pacientes, diferencias que pudiesen deberse a la presencia de otros polimorfismos en el gen *NOS2A*, los cuales han sido asociados con variaciones en las concentraciones de NO. Las altas concentraciones de NO en el grupo control PPD+ estaría correlacionada con la inhibición del crecimiento intracelular de la micobacteria *Mycobacterium tuberculosis*, sugiriendo que los macrófagos alveolares producen NO suficiente para controlar la infección (Rich, E., y col., 1997). Diferentes estudios han demostrado que los macrófagos alveolares son capaces de matar micobacterias y que estas actividades anti-microbianas son dependientes de la expresión de NOS2 (Jagannath, C., y Hunter, R., 1998; Nozaki, Y. y col., 1997), sugiriendo que la producción de óxido nítrico y su posterior oxidación, generando intermediarios de nitrógeno, desempeña un papel importante en la defensa del hospedero contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 14) (Revisado en: Yang, CS., y col., 2009).

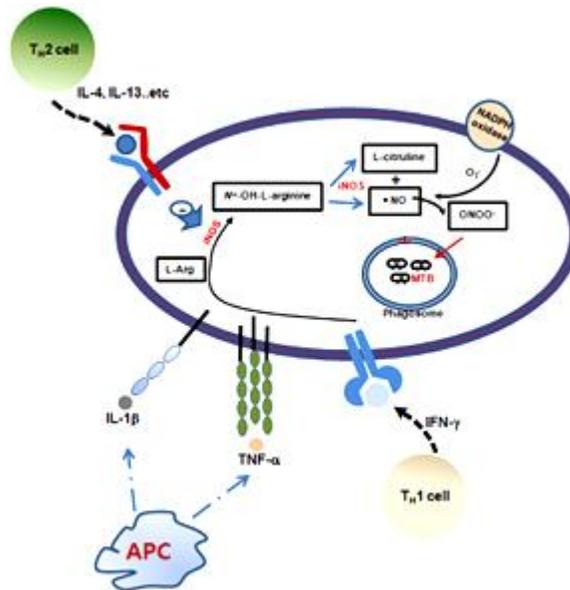


Figura 14. Esquema general de la síntesis, regulación y función anti-microbiana de NO en infección por micobacterias. A partir de L-arginina y O₂ con participación de NOS2 (iNOS) se genera L-citulina y NO. La oxidación de NO genera intermediarios del nitrógeno, como el ONOO⁻, el cual puede matar directamente a *Mycobacterium tuberculosis*. El NO está regulado positivamente por IFN-γ y TNF-α, y regulados negativamente por las citocinas, IL-4 e IL-13 (Revisado en: Yang, CS., y col., 2009).

Estos resultados demuestran que en los individuos PPD positivos, es decir pacientes cuyo sistema inmunológico ha estado en contacto con el bacilo, desarrollan una respuesta inmunitaria que permite la eliminación del bacilo, controlando así la infección y el desarrollo de tuberculosis (Revisado en: Ahmad, S., 2010). Cabe destacar que los efectos de los derivados de NO contra patógenos son variados, el NO puede reaccionar directamente sobre elementos estructurales de la maquinaria de replicación, ácidos nucleicos, enzimas metabólicas y moléculas asociadas a la virulencia del patógeno,

constituyendo los efectos antimicrobianos más fuertes del NO (Jones-Carson, J., y col., 2008). Además, los derivados de NO pueden tener efectos indirectos, como: 1- la estimulación de la maduración y la fusión del fagolisosoma (Axelrod, S., y col., 2008), 2- inhibición de la expresión de los sistemas de secreción bacteriana, de moléculas efectoras y de adhesión, 3- la dispersión de biopelículas bacterianas y 4- efectos inmuno-reguladores sobre diferentes tipos de células del sistema inmunitario (Figura 15) (Revisado en Bogdan, 2015). En relación a los efectos inmuno-reguladores, el NO producido por macrófagos y células fagocíticas puede actuar como una molécula efectora durante mecanismos innatos de defensa del hospedero. Como es bien sabido la expresión de NOS2, y por ende, la síntesis de NO, es inducido por citocinas, tales como TNF- α , IL-1 β junto con IFN- γ , que es producido por los linfocitos T, estas citocinas se segregan al momento del reconocimiento de PAMPs en la superficie de *Mycobacterium tuberculosis* (Yang, CS., y col., 2009)

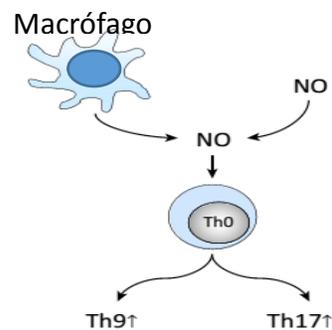


Figura 15. Efecto del NO en las células del sistema inmunitario. Uno de los efectos es el de cooperar en la diferenciación de las células Th a Th9 y Th17 (Niedbala, W., y col., 2014; Obermajer, N., y col., 2013).

Finalmente, al realizar las correlaciones de las concentraciones de nitritos con el genotipo en los pacientes con tuberculosis, no observamos una diferencia significativa entre los distintos genotipos (GG y GC) y la concentración de nitritos ($p=0.06$), sugiriendo que otras variantes del gen *NOS2A* pudiesen estar determinando la concentración de óxido nítrico.

En conclusión, el NO es una molécula antimicrobiana que participa en la respuesta inmunitaria, controlando la infección y el desarrollo de tuberculosis, como lo demostró su alta concentración en controles PPD + con respecto a los pacientes. Por otra parte, la concentración de óxido nítrico estaría determinada por otras variantes del gen *NOS2A*, así como por inductores de este gen, tales como los microRNAs y NATs (transcriptos antisentido no codificantes naturales). Por tal motivo, se sugiere realizar estudios posteriores sobre las asociaciones entre combinaciones genotípicas y/o haplotípicas del gen *NOS2A* y la susceptibilidad a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y el desarrollo de tuberculosis.

CONCLUSIONES

- No hay asociación entre los genotipos y alelos de la variante *NOS2A-G954C* y la susceptibilidad a desarrollar TB pulmonar.
- Altas concentraciones de óxido nítrico (nitritos) controla la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.
- No hay una correlación entre la presencia de los genotipos de la variante *NOS2A-G954C* y las concentraciones de nitritos plasmáticos en pacientes con TB pulmonar.
- La presencia de otras variantes del gen *NOS2A* pudiesen estar determinando las concentraciones de óxido nítrico

BIBLIOGRAFÍA

Algood, H. M. C., Chan, J., Flynn, J. L. 2003. Chemokines and Tuberculosis. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* **14** (6): 467-477.

Ahmad, S. 2010. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**: 1-17.

Arens, M. 2001. Clinical relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV and HIV. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 11-29.

Arentz, M., y Hawn, T. 2007. Tuberculosis Infection: Insight from Immunogenomics. *Drug. Discov. Today. Dis. Mech.* **4** (4): 231-236.

Akira, S., Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124** (4): 783-801.

Axelrod, S. y colaboradores. 2008. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell. Microbiol.* **10**: 1530-1545.

Barral, D. C., Brenner, M. B. 2007. CD1 antigen presentation: how it works. *Nature. Immunol.* **7** (12): 929-941.

Bermudez, L. E., Sangari, F. J., Kolonoski, P., Petrofsky, M., Goodman, J. 2002. The efficiency of the Translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within

mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* **70** (1): 140-146.

Bodnar, K. A., Serbina, N. V., Flynn, J. L. 2001. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infect. Immun.* **69** (2): 800-809.

Bogdan, C., 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **36** (3): 161-178.

Bunce, M. 2000. Histocompatibility testing. Ed: Lindwell and Navarrete C. Imperial College Press, London.

Burgner, D., Xu, W., Rockett, K., Gravenor, M., Charles, I. G., Hill, A., Kwiatkowski, D. 1998. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet.* **352**: 1193-1194.

Burgner, D. Rockett, K., Kwiatkowski, D. 1999. Nitric oxide and infectious diseases. *Dis Childhood* **81**: 185-188.

Calzada, J. E., López-Nevot, M. A., Beraún, Y., Martín, J. 2002. No Evidence for association of the inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism with *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue. Antigens.* **59**: 316-319.

Caruso, A. M., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B. R., Flynn J. L. 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to Tuberculosis. *J. Immunol.* **162** (9): 5407-5416.

Chan, J., Flynn J. L. 2004. The immunological aspects of latency in Tuberculosis. *Clin. Immunol.* **110** (1): 2-12.

Coia, V., Jülinger, S., Mordmüller, B., Kreidenweis, A., Stroh, A., Ortega, C., Vindigni, A., Dengjel, J., Lukyanov, D., Destro-Bisol, G., Fedorov, A., Podgornaya, O., Kun, J. 2005. Analysis of polymorphic sites in the promoter of the nitric oxide synthase 2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**: 1123-1131.

Coleman, J. W. 2002. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **129**: 4-10.

Cooper, A. M. 2009. Cell-mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **27**: 393-422.

Cortas, N., y Waldd, N. 1990. Determination of Inorganic Nitrate in Serum and Urine by a Kinetic Cadmium Reduction. *Clin. Chem.* **36** (8): 1440: 1443.

Flores-Villanueva, P., Ruiz-Morales, J., Song, CH., Flores, L., Jo, E., Montaña, M., Barnes, P., Selma, M., Granados, J. 2005. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary Tuberculosis. *J. Exp. Med.* **202** (12): 1649-1658.

Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J., Dye, C. 2003. Tuberculosis. *Lancet.* **362** (9387): 887-899.

Gómez, L. M., Anaya, J. M., Vilchez, J. R., Cadena, J., Hinojosa, R., Vélez, L., López-Nevot, M. A., Martín, J. 2007. A polymorphism in the inducible nitric oxide synthase gene is associated with Tuberculosis. *Tuberculosis.* **87**: 288-294.

González-Juarrero, M., Turner, O. C., Turner, J., Marietta, P., Brooks, J. V., Orme, I. M. 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocyte within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **69** (3): 1722-1728.

Harding, C. V., Boom, W. H. 2010. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-Like receptors. *Nature. Rev. Microbiol.* **8** (4): 296-307.

Hobbs, R., Udhayakumar, V., Levesque, M., Booth, J., Roberts, J., Tkachuk, A., Pole, A., Coon, H., Kariuki, S., Nahlen, B., Mwaikambo, E., Lal, A., Granger, D., Anstey, N., Weinberg, J. 2002. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children Maurine. *Lancet.* **360**: 1468–1475

Jagannath, C., Actor, J. y Hunter, R. 1998. Induction of nitric oxide in human monocytes and monocyte cell lines by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nitric Oxide.* **2**: 174-186.

Jo, E. K. 2008. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-Type lectins, and NLRs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21** (3): 279-286.

Jones-Carson, J. y colaboradores. 2008. Inactive of [Fe-S] metalloproteins mediated nitric oxide-dependet killing of *Burkholderia mallei*. *Plo. S. ONE3.* e1976.

Kim, B., Kim, W., Park, D., Chung, W., Shin, K., Bhak, J. 2008. SNP Promoter: a database of human SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) within the putative promoter regions. *BMC Bioinformatics.* **9**: 1-5.

Kun, J. F., Mordmüller, B., Perkins, D. J., May, J., Mercereau-Puijalon, O., Alpers, M., Weinberg, J. B., Kremsner, P. G. 2001. Nitric Oxide Synthase 2^{Lambaréné} (G-954C),

Increased Nitric Oxide Production, and Protection against Malaria. *J. Infect. Dis.* **184**: 330-336.

Leandro, A. C., Andrade, M. R., Lamoglia-Souza, A., Vand, J. L., Cavalcentt, V., da Gloria, M. 2013. No Association of ING +874T/A SNP and NOS2A -954G/C SNP variants with Nitric Oxide Radicals Serum Levels or Susceptibility to Tuberculosis in a Brazilian population subset. *BioMed. Res. Internat.* **2013**: 1-7.

Lison, L. Estadística Apliada a la Biología Experimental. Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1976. 307-310

MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K., Nathan, C. F. 1997. Identification of Nitric Oxide Synthase as a protective locus against Tuberculosis. *Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 5243-5248.

Martín, J., Calzada, J. E., Nieto, A. 1999. Inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene polymorphism and parasitic diseases. *Lancet.* **353**: 72.

Mattila, J., Thomas, A. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front. Immunol.* **5** (478).

Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A. 2001. A rapid, simple Spectrophotometric Method for simultaneous detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide.* **5**: 62-71.

Möller, M., Nebel, A., Valentonyte, R., van Helden, P., Schereiber, S. y Hoal, E. 2009. Investigation of Chromosome 17 candidate genes susceptibility to TB in a South African population. *Tb.* **89** (2): 189-194.

Nicholson, S., Almeida, B., da G, M., Nathan, J. R. 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis *J. Exp. Med.* **183**: 2293-2302.

Niedbala, W. y colaboradores. 2014. Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and air way inflammation. *Nat. Commun.* **5** (4575).

Nozaki, Y., Hasegawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, I. y Shimokata, K. 1997. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immun.* **65** : 3644-3647.

Qidwai, T., Jamal, F. 2010. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene Polymorphism and Disease Prevalence. *Scand. J. Immunol.* **72**: 375-387.

Rich, E., Torres, M., Sada, E., Finegan, C., Hamilton, B. y Toozi, Z. 1997. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-Stimulated) production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber. Lung. Dis.* **78**: 247-255.

Rodríguez-Ortega, M. 1998. Óxido Nítrico en la Patología del Dengue. *Acta Cien. Vene.* **49** (1): 8-12.

Rodríguez, S., Gaunt, T., y Day, I. 2009. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am. J. Epidemiol.* 1-10

Ryk, C., Hou, SM., Pershagen, G., Wiklund, N., Nyberg, F., de Verdier, P. 2014. The (CCTTT)_n microsatellite polymorphism in the NOS2 gene may influence lung cancer risk and long-term survival, especially in non-smokers. *Tumour. Biol.* **35** (5): 4425-4434.

Teitelbaum, R., Schubert, W., Gunther, L. 1999. The M cell aportal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immun.* **10** (6): 641-650.

Tsikakos, D. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/ nitric oxide area of research. *J. Chromatogr.* **851**: 51-70.

Ulrichs, T., Kaufmann, S. H. E. 2006. New insights into the fuction of granulomas in human Tuberculosis. *J. Pathol.* **208** (2): 261-269.

Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B. 2008. Initiation of the adaptative immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lung. *J. Exp. Med.* **205** (1): 105-115.

Woolf, B. 1995. On estimating the relationship between blood and disease. *Annals of Human Genetics. Haldane JBS.* **19**: 251-253.

World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2012. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf

World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2013. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf

World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

Yang, CH., Yuk, JM. y Jo, EK. 2009. The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections. *Immun. Netwk.* **9**: 46-52.

Young, D.B., Gideon, H. P., Wilkinson, R. J. 2009. Eliminating latent Tuberculosis. *T.I.M.* **17** (5): 183-188.

ANEXOS

Anexo 1

1. Obtención de la muestra de muestra

EDTA 0,4M pH 8

148,88 g en 1 litro, autoclavar

Para cada 10 ml de sangre 100 µl de EDTA 0,4M

2. Reactivos para extracción del ADN.

RCLB

0,144 M de cloruro de amonio (NH_4Cl)

1mM de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Disolver 15,4 g de NH_4Cl y 1,68 M de NaHCO_3 en 2 litros de H_2O dd.

Buffer de lisis nuclear (NLB)

10 mM Tris-HCl pH 8,2

0,4 cloruro de sodio (Na Cl)

2mM de EDTA disódico pH 8,0

Disolver 23,37 g de NaCl en 900 ml de agua destilada. Añadir 10 ml de Tris-HCl 1 M pH 8,2 y 10 ml de EDTA disódico pH 8.0 y alcanzar un litro con H_2O dd.

Buffer NLB + SDS

Combinar 300 ml de NLB con 20 ml de SDS 10%, almacenar a 20°C para prevenir la formación de precipitados

Etanol 95%

Combinar 950 ml de etanol absoluto con 50 ml de H_2O dd.

Etanol 70%

Combinar 700 ml de etanol absoluto y 300 ml de H_2O dd.

NaCl 5,25M PM= 58,44 g/mol

Disolver con calentamiento 11,1 g de NaCl en 800 ml de H₂O dd y alcanzar un litro con H₂O dd.

Buffer EE

Epps 0,1M 25 ml

Na(OH) 0,1N 14,3 ml

EDTA 0,5 pH 8 50 µl

H₂O –DEPC hasta 250 ml

Autoclavar.

3. Reactivos para gel de electroforesis

TBE 10X pH 8.2

Trisma base 60,6 g

Acido Bórico 41,4 g

EDTA 0,25 M 40 ml.

TBE 1X

100 ml de TBE 10X y añadir agua hasta llevar a un litro.

Bromuro de etidio

Bromuro de etidio 10 mg/ml.

El bromuro de etidio es altamente mutagénico, guardar en envase oscuro y a 4°C.

Buffer de Carga (Azul de Bromofenol)

TBE 10X 5ml

Glicerol 4,9 ml

SDS 10% 0,1 ml

Añadir pequeñas cantidades de Azul Bromofenol.

4. Reactivos para la desproteinización del suero.

Sulfato de Zinc (ZnSO₄) 75 mM

Agregar 21,57 g en un litro de agua miliQ.

Hidróxido de Sodio (NaOH) 55 mM

Agregar 2,2 g en un litro de agua miliQ

5. Reactivos para la activación del Cadmio.

Sulfato cúprico (CuSO₄) 5 mM

Agregar 0,8 g en un litro de agua miliQ.

Buffer Glicina NaOH 2 M

7,5 g de glicina (Sigma, USA)

500 ml H₂O desionizada.

Ajustar pH con NaOH 2 M (80 g de NaOH en un litro de agua miliQ).

Anexo 2

CONSENTIMIENTO VALIDO

GRUPO CONTROL SANO

La tuberculosis es un problema de salud pública en Venezuela, es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual entra al organismo por las vías respiratorias, estableciendo el sitio inicial de infección en los pulmones y pudiéndose diseminar a otras partes del cuerpo, tales como la pleura, los huesos, el sistema genito urinario, las meninges, peritoneo o piel, y producir la tuberculosis extra pulmonar, la cual sucede en aproximadamente un 15% de los pacientes infectados. El control de la tuberculosis es difícil, debido en parte a los factores genéticos que pueden hacer a los individuos infectados más susceptibles para desarrollar la enfermedad severa, mientras otros no. Dada su importancia, en el presente proyecto, el Laboratorio de Fisiopatología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en conjunto con el Servicio de Neumonología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal, llevarán a cabo el proyecto titulado "**Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis**" que intentará dilucidar la interacción de estos factores inmunes sobre la incidencia de la tuberculosis para mejorar así el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes, al identificar los factores de riesgo que influyen en la evolución de la enfermedad.

Yo, _____ C.I.: _____

Nacionalidad _____ Estado _____ Civil _____ Domiciliado en: _____
_____, siendo mayor de 18 años en USO pleno mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que mas abajo índico, declaro mediante la presente:

1.- Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación epidemiológica titulado: "**Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis**".

2.- Tener conocimiento claro que el objetivo fundamental del trabajo es determinar marcadores de la respuesta inmune, que permitan conocer la susceptibilidad a la tuberculosis y permitan predecir la evolución clínica de la enfermedad.

3.- Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador; en el cual se establece que la participación de mi persona en el trabajo, consiste en donar al Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, una muestra de sangre de 10 mL la cual se le extraerá mediante punción venosa, previa asepsia y antisepsia de la región anterior del antebrazo por una persona capacitada y autorizada por el referido laboratorio.

4.- Que la muestra sanguínea que acepto sea donada por mi persona, así como la información que suministre al equipo de Investigadores coordinados por el jefe del Laboratorio de Fisiopatología, será utilizada única y exclusivamente para determinar: **“El Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis”**.

5.- Haber sido informado que mi participación en el proyecto es en calidad de control o persona sana y que mi participación consistirá en la donación de 5ml de sangre periférica, la cual se tomará por punción venosa será utilizada para extraer ADN con el fin de determinar marcadores biológicos.

6.- Que el equipo de investigadores coordinados por el Jefe del Laboratorio de Fisiopatología, me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa, a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.

7.- Que bajo ningún concepto podré restringir el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos presente estudio.

8.-Que la participación de mi persona en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud, así como que dicho estudio no forma parte de una terapia paliativa o curativa.

9.- El sobrante de la muestra, donada por mi representado, será guardado y utilizado en futuros estudios del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, siempre y cuando sus resultados sean utilizados con fines académicos y no comerciales, previa aprobación del Comité de Bioética y en relación a estudios de los factores inmunes y las enfermedades infectocontagiosas.

10.- Que el equipo de investigadores coordinados por el Jefe del Laboratorio de Fisiopatología, me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa, a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.

11.- Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente parte del equipo de médicos tratantes, con quien me puedo comunicar: Dra. Zhenia Fuentes, Coordinadora del Postgrado de Neumonología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal.

12.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación. Que los resultados de las pruebas realizadas a mi persona, me serán entregados oportunamente.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C) a realizar el referido estudio en las muestras de sangre que acepto donar a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del Voluntario_____

Firma del Investigador_____

Nombres_____

Nombres_____

C.I._____

C.I._____

Lugar_____

Lugar_____

Fecha_____

Fecha_____

Firma Testigo:

Firma Testigo:

Nombres_____

Nombres_____

C.I._____

C.I._____

Lugar_____

Lugar_____

Fecha_____

Fecha_____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Por el Laboratorio de Fisiopatología:

Lugar y Fecha:

Anexo 3

CONSENTIMIENTO VALIDO

Menores de edad con diagnóstico Clínico de Tuberculosis

La tuberculosis es un problema de salud pública en Venezuela, es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual entra al organismo por las vías respiratorias, estableciendo el sitio inicial de infección en los pulmones y pudiéndose diseminar a otras partes del cuerpo, tales como la pleura, los huesos, el sistema genito urinario, las meninges, peritoneo o piel, y producir la tuberculosis extra pulmonar, la cual sucede en aproximadamente un 15% de los pacientes infectados. El control de la tuberculosis es difícil, debido en parte a los factores genéticos que pueden hacer a los individuos infectados más susceptibles para desarrollar la enfermedad severa, mientras otros no. Dada su importancia, en el presente proyecto, el Laboratorio de Fisiopatología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en conjunto con el Servicio de Neumonología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal, llevarán a cabo el proyecto titulado "**Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis**" que intentará dilucidar la interacción de estos factores inmunes sobre la incidencia de la tuberculosis para mejorar así el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes, al identificar los factores de riesgo que influyen en la evolución de la enfermedad.

Yo, _____ C.I.: _____
Nacionalidad _____ Estado Civil _____

Representante Legal de _____ C.I.: _____, siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que más abajo índico, declaro mediante la presente:

- 1.- Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación epidemiológica titulado: "**Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis**".
- 2.- Tener conocimiento claro que el objetivo fundamental del trabajo es determinar marcadores de la respuesta inmune, que permitan conocer la susceptibilidad a la tuberculosis y permitan predecir la evolución clínica de la enfermedad.
- 3.- Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador; en el cual se establece que la participación de **mi Representado** en el trabajo consiste en donar al Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, una muestra de sangre de 10 mL la cual se le extraerá mediante punción venosa, previa asepsia y antisepsia de la región anterior del antebrazo por una persona capacitada y autorizada por el referido laboratorio.

4.- Que la muestra sanguínea que acepto sea donada por **mi Representado** así como la información suministre al equipo de Investigadores coordinados por el jefe del Laboratorio de Fisiopatología, será utilizada única y exclusivamente para determinar: “**El Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis**”.

5.- El sobrante de la muestra, donada por mi representado, será guardado y utilizado en futuros estudios del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, siempre y cuando sus resultados sean utilizados con fines académicos y no comerciales, previa aprobación del Comité de Bioética y en relación a estudios de los factores inmunes y las enfermedades infectocontagiosas.

6.- Que el equipo de investigadores coordinados por el Jefe del Laboratorio de Fisiopatología, me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa a **mi Representado** a la que tengan acceso por concepto de su participación en el proyecto antes mencionado.

7.- Que bajo ningún concepto podré restringir el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos presente estudio.

8.-Que la participación de mi Representado en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para su salud, así como que dicho estudio no forma parte de una terapia paliativa o curativa.

9.- Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente parte del equipo de médicos tratantes, con quien me puedo comunicar: Dra. Zhenia Fuentes, Coordinadora del Postgrado de Neumonología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal.

10.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación. Que los resultados de las pruebas realizadas a mi representado me serán entregados oportunamente.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento:

A.- Acepto las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores coordinados por el Jefe del Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental, del Instituto Venezolano Investigaciones Científicas (I.V.I.C) a realizar el referido estudio en la muestra de sangre que sea donada por **mi Representado** a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento sin que conlleve algún tipo de consecuencia negativa para **mi Representado.**

Representante Legal:

Nombres _____ Firma del Investigador _____

C.I: _____ Nombres _____

Firma _____ C.I. _____

Lugar _____ Lugar _____

Fecha _____ Fecha _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al Sr. (a). _____, Representante Legal de _____, la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médico, idioma o de instrucción han impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Por el Laboratorio de Fisiopatología:

Lugar y Fecha:

Anexo 4

CONSENTIMIENTO VALIDO

Pacientes mayores de edad con diagnóstico clínico de Tuberculosis

La tuberculosis es un problema de salud pública en Venezuela, es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual entra al organismo por las vías respiratorias, estableciendo el sitio inicial de infección en los pulmones y pudiéndose diseminar a otras partes del cuerpo, tales como la pleura, los huesos, el sistema genito-urinario, las meninges, peritoneo o piel, y producir la tuberculosis extra pulmonar, la cual sucede en aproximadamente un 15% de los pacientes infectados. El control de la tuberculosis es difícil, debido en parte a los factores genéticos que pueden hacer a los individuos infectados más susceptibles para desarrollar la enfermedad severa, mientras otros no. Dada su importancia, en el presente proyecto, el Laboratorio de Fisiopatología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en conjunto con el Servicio de Neumonología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal, llevarán a cabo el proyecto titulado "**Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis**" que intentará dilucidar la interacción de estos factores inmunes sobre la incidencia de la tuberculosis para mejorar así el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes, al identificar los factores de riesgo que influyen en la evolución de la enfermedad.

Yo, _____ C.I.: _____

Nacionalidad _____ Estado _____ Civil _____ Domiciliado en: _____
_____, siendo mayor de 18 años en USO pleno mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que mas abajo índico, declaro mediante la presente:

1.- Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación epidemiológica titulado: "**Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis**".

2.- Tener conocimiento claro que el objetivo fundamental del trabajo es determinar marcadores de la respuesta inmune, que permitan conocer la susceptibilidad a la tuberculosis y permitan predecir la evolución clínica de la enfermedad.

3.- Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador; en el cual se establece que la participación de mi persona en el trabajo, consiste en donar al Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, una muestra de sangre de 10 mL la cual se le extraerá mediante punción venosa, previa asepsia y

antisepsia de la región anterior del antebrazo por una persona capacitada y autorizada por el referido laboratorio.

4.- Que la muestra sanguínea que acepto sea donada por mi persona, así como la información suministre al equipo de Investigadores coordinados por el jefe del Laboratorio de Fisiopatología, será utilizada única y exclusivamente para determinar: **“El Polimorfismo genético y susceptibilidad a tuberculosis”**.

5.- El sobrante de la muestra, donada por mi persona, será guardado y utilizado en futuros estudios del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, siempre y cuando sus resultados sean utilizados con fines académicos y no comerciales, previa aprobación del Comité de Bioética y en relación a estudios de los factores inmunes y las enfermedades infectocontagiosas.

6.- Que el equipo de investigadores coordinados por el Jefe del Laboratorio de Fisiopatología, me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa, a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.

7.- Que bajo ningún concepto podré restringir el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos presente estudio.

8.-Que la participación de mi persona en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud, así como que dicho estudio no forma parte de una terapia paliativa o curativa.

9- Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente parte del equipo de médicos tratantes, con quien me puedo comunicar: Dra. Zhenia Fuentes, Coordinadora del Postgrado de Neumonología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal.

10.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación. Que los resultados de las pruebas realizadas a mi representado me serán entregados oportunamente.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C) a realizar el referido estudio en las muestras de sangre que acepto donar a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del Voluntario_____

Firma del Investigador_____

Nombres_____

Nombres_____

C.I._____

C.I._____

Lugar_____

Lugar_____

Fecha_____

Fecha_____

Firma Testigo:

Firma Testigo:

Nombres_____

Nombres_____

C.I._____

C.I._____

Lugar_____

Lugar_____

Fecha_____

Fecha_____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción han impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Por el Laboratorio de Fisiopatología.

Lugar y Fecha.

Anexo 5

Fecha:

Historia Nº:

ENCUESTA PACIENTES-CONTROLES TUBERCULOSIS

DATOS DEL PACIENTE

Nombres y Apellidos _____ Edad _____ Sexo _____
Fecha de Nacimiento _____ Lugar de Nacimiento _____

País y lugar de origen de la madre _____

País y lugar de origen del padre _____

País y lugar de origen de la abuela materna _____

País y lugar de origen del abuelo materno _____

País y lugar de origen de la abuela paterna _____

País y lugar de origen del abuelo paterno _____

Zona de vivienda urbana rural

Tipo de vivienda rancho casa apartamento

Grado instrucción _____ Ocupación _____

HISTORIA MÉDICA

a) Condiciones asociadas

	Si	No
Malnutrición	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tabaquismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Cantidad diaria _____
Alcoholismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Cantidad diaria _____
Drogadicción	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cicatriz BCG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

b) Síntomas (Fecha de aparición: _____)

	Si	No
Tos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pérdida de peso	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sudoración	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disnea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Astenia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dolor torácico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hemoptisis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

EXÁMENES CLÍNICOS

	Si	No
Baciloscopia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cultivo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Radiografía de Tórax	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lesiones unilaterales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lesiones bilaterales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cavernas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PPD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/> NR <input type="checkbox"/>

Observaciones:

Anexo 6

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
PROYECTO POLIMORFISMO GENETICO Y SUCEPTIBILIDAD TUBERCULOSIS
FORMATO CONTROL

Numero Historia Clínica: _____

Fecha de Ingreso: _____

Datos clínicos:

Inicial del Nombre y Apellidos: _____

Lugar de nacimiento: _____

Dirección Habitual: _____

Dirección de Pareja o Cónyuge: _____

Datos Personales del Paciente:

Sexo: _____ Raza o Grupo Étnico: _____ Edad: _____ Peso; _____ Nivel Socioeconómico _____ Grado de Instrucción: _____ Teléfono: _____

Síntomas, inicio y duración de los mismos:

Tos: ____ fiebre: ____ Pérdida de peso: ____, decaimiento: ____, Sudores: ____, Disnea: ____

Resultados de la Tele de Tórax; _____

BK: _____ Fecha: _____ PPD: _____ Fecha _____

Diagnostico de: TB pulmonar _____ Extra-pulmonar: _____

Fecha del Diagnostico: _____ Inicio de tratamiento: _____

Tratamientos recibidos y Fecha: _____

Tiempo de tratamiento: _____ Número de Veces: _____

Cepa resistente _____ A cuáles antibióticos: _____

Antecedentes Familiares:

Padres Lugar de Nacimiento: _____

Antecedentes Familiares de enfermedades Autoinmunes y Parentesco: _____

Dirección de Posibles Contactos: _____

Exámenes de laboratorio Realizados: HIV: _____ Otros: _____

Las siguientes muestras serán tomadas:

Un tubo de 10 ml. de sangre para DNA: _____ Otros: _____

Tomado por: _____

Médico Tratante: _____ Lugar: _____ Teléfono: _____