

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**



**Asociación del polimorfismo -173 G/C del factor inhibitorio de la
migración de macrófagos (MIF) y el desarrollo de lepra
lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

José Roberto Estupiñán Jiménez

Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio de 2015

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



Asociación del polimorfismo -173 G/C del factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) y el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

José Roberto Estupiñán Jiménez

Directora de Tesis

Dra. en C. Mary Fafutis Morris

Asesoras de Tesis

Dra. en C. Anabell Alvarado Navarro

Dra. Anne Marguerite Helene Santerre

Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio de 2015

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología, perteneciente al Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara, con sede en el Instituto Dermatológico de Jalisco “Dr. José barba Rubio”.

Bajo la dirección de:

Dra. en C. Mary Fafutis Morris

Asesoría de:

Dra. en C. Anabell Alvarado Navarro

Dra. Anne Marguerite Helene Santerre

Sinodales:

Dr. en C. Alfonso Enrique Islas Rodríguez

Dra. Rosa María Domínguez Arias

Dra. María del Rosario Huizar López



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. JOSÉ ROBERTO ESTUPIÑÁN JIMÉNEZ.
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "Asociación del polimorfismo -173 G/C del factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) y el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: **Dra. Mary Fafutis Morris** y como asesores a: **Dra. Anabell Alvarado Navarro** y **Dra. Anne Marguerite Helene Santerre**.
Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 25 de mayo de 2015


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN




DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ.
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México. C.P. 45110. AP 39-82. Tels. (01-33) 3777- 1168 3777-1150, ext. 33118.

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e Informes**, opción **Tesis** con el título: **“Asociación del polimorfismo -173 G/C del factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) y el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México”** que realizó el/la pasante **C. José Roberto Estupiñán Jiménez** con número de código **207547331** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

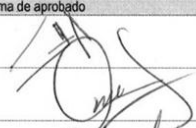
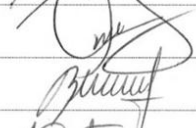
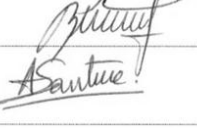
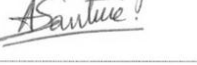
Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 24 de Junio del 2015



 Dra. en C. Anabell Alvarado Navarro
 Asesor


 Dra. en C. Mary Fafutis Morris
 Directora del trabajo


 Dra. Anne Marguerite Helene Santerre
 Asesor



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		24 Junio 15
Dra. Rosa María Domínguez Arias		24 Junio/15
Dra. María del Rosario Huizar López		24/5 Junio/15
Supl. Dra. Anne Marguerite Helene Santerre		24 junio 2015


 29-06-15

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora, la Dra. en C. Mary Fafutis Morris y Asesora Dra. en C. Anabell Alvarado Navarro por permitir que me integrara al equipo de trabajo del CIINDE y principalmente por siempre apoyarme en la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del CIINDE, especialmente a Marco Alonso Martínez Guzmán quien se volvió un gran compañero de trabajo pero sobre todo un excelente amigo.

A mis sinodales Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez, Dra. Rosa María Domínguez Arias, Dra. María del Rosario Huizar López y Asesora Interna Dra. Anne Marguerite Helene Santerre.

Al Instituto Dermatológico “Dr. José Barba Rubio” y a sus pacientes, ya que sin ellos la realización de este estudio no hubiera sido posible.

Finalmente a mi casa de estudios, la Universidad de Guadalajara-Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, por apoyarme en esta importante etapa de formación académica.

A todos, gracias.

DEDICATORIAS

A mis padres Roberto Estupiñán Montes y María Teresa Jiménez Castellanos por siempre apoyarme para alcanzar mis objetivos y principalmente por siempre creer en mí, sin su apoyo este momento hubiera sido imposible de alcanzar, gracias por jamás dudar de mí, ahora es mi turno de tratar de regresarles un poco de todo lo que me han dado.

A mi abuelita Concepción Castellanos Ledezma que fue otra mamá para mí y una parte fundamental de este logro. Sé que aunque no te pueda ver en estos momentos estás a mi lado como siempre lo has hecho. A mi hermana Alejandra Jiménez Castellanos que siempre me ha impulsado para poder alcanzar mis objetivos y me ha regañado cuando es necesario.

A los integrantes de mi familia materna que de alguna forma siempre han sido un apoyo para mí como mi Tía Mago, Tía Pina, Tía Mary y Tío Miguel, de igual manera a los de mi familia paterna Tío Toño, Tío Jaime, Tío Alejandro, Tía María y Tío Luciano, Tía Tere, todos con sus respectivas familias.

A mi novia Jesica Ramírez Villalobos, por acompañarme en este proceso lleno de cambios y obstáculos, contigo fue más fácil superarlos. Canada is waiting for us!!

Gracias a todos mis amigos desde “La rocky” hasta los “Orcos”.

A todos los perros y gatos de la calle que día a día son una motivación para mí, ya que mi deseo de poder ayudarlos es cada día más grande. Chapa, Wilma, Venada, Junior gracias por siempre estar allí para recibirme en casa después de un día difícil, y gracias a los que ya no están por haber marcado mi vida para bien: Pancha, Duque, Palomo y sobre todo mi pequeña Ayla.

A Avril Lavigne por ayudarme con su música en esos momentos difíciles y que sin canciones como “Anything but Ordinary” o “Here’s to never growing up” hubieran sido más difíciles de superar. A mi ídolo “Rocky” por introducirme en un deporte como el BOX, que me ayudó mucho unos años atrás a seguir adelante.

“Déjame decirte algo que ya sabes, el mundo no es arcoíris y amaneceres, en realidad es un lugar malo y asqueroso, y no le importa lo duro que seas, te golpeará y te pondrá de rodillas y ahí te dejará si se lo permites. Ni tú ni nadie golpeará tan fuerte como la vida. Pero no importa lo fuerte que puedas golpear, importa lo fuerte que pueda golpearte y seguir avanzando, lo mucho que puedas resistir y seguir adelante, eso es lo que hacen los ganadores. Ahora, si sabes lo que vales, ve y consigue lo que vales, pero debes ser capaz de recibir los golpes y no apuntar con el dedo y decir que eres lo que eres por culpa de ese o el otro, eso lo hacen los cobardes y tú no eres un cobarde. Tú eres mejor que eso” Rocky Balboa

Espero que esta frase tenga el mismo efecto que tuvo conmigo en alguien más.

Una mención especial para la Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández ya que si no me hubiera impartido la clase de Biología Molecular en el 3° semestre muy probablemente no sería Biólogo.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1.-INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
2.1.- Genética del Hospedero y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas	3
2.2.- Lepra o enfermedad de Hansen	3
2.2.1.- Aspectos históricos	3
2.2.2 Etiología	4
2.2.2.1 Genoma de <i>M. leprae</i> y su evolución reductiva	5
2.2.3.- Clasificación y características de la lepra	6
2.2.4.- Tratamiento	8
2.2.5 Epidemiología.....	9
2.2.6 Genética de la lepra	10
2.3.- Factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF)	14
2.3.1 Estructura y función.....	14
2.3.1.1 MIF y procesos inflamatorios.....	17
2.3.2 Vía de acción de MIF	18
2.3.2.1 Activación de la vía de señalización ERK1-ERK2.....	18
2.3.2.2 Expresión de TLR4.....	18
2.3.2.3 MIF suprime la activación de p53	19
2.3.3 Estructura del gen de <i>MIF</i>	20
2.3.4 Polimorfismos en la región promotora de <i>MIF</i>	20
2.3.5 MIF en enfermedades infecciosas	21
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4.- HIPÓTESIS	24
5.- OBJETIVOS	25
5.1.- Objetivo general	25
5.2.- Objetivos particulares.....	25
6.- DISEÑO METODOLÓGICO	26
6.1.- Tipo de estudio.....	26
6.2.- Sedes de estudio	26
6.3.- Consideraciones éticas y de bioseguridad	26
6.4 Universo de estudio.....	26
6.5 Tamaño de la muestra.....	26
6.6 Periodo de estudio	27
6.7 Criterios de selección	27

6.7.1.- Criterios de inclusión	27
6.7.2.- Criterios de exclusión	27
6.7.3.- Criterios de no inclusión	28
6.8 Criterios de interpretación	28
6.9 Variables	28
6.9.1 Dependientes	28
6.9.2 Independientes.....	28
6.10.- Métodos	28
6.10.1.- Análisis molecular	28
6.10.1.1 Toma de muestras sanguíneas de controles y pacientes con lepra lepromatosa	28
6.10.1.2 Extracción de ADNg	29
6.10.1.3.- Cuantificación de ADN	30
6.10.1.4.- Identificación del polimorfismo -173 G/C en el gen <i>MIF</i>	30
6.10.3.- Análisis estadístico.....	34
6.10.4.- Diagrama de trabajo.....	35
7.- RESULTADOS	36
7.1.- Características de los pacientes.....	36
7.2.- Amplificación del fragmento polimórfico -173 G/C de <i>MIF</i>	37
7.3 Optimización de la PCR	39
7.4 Genotipificación del polimorfismo -173 G/C de <i>MIF</i>	40
8.- DISCUSIÓN.....	43
9.- CONCLUSIONES	46
10.- PERSPECTIVAS	47
11.- ANEXOS	48
REFERENCIAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Modelo esquemático de susceptibilidad genética a la lepra	13
2	Patrones de expresión de MIF	15
3	Estructura tridimensional de MIF	16
4	Estructura del gen de MIF	20
5	Representación bioinformática de la unión de los iniciadores a la región de estudio del gen <i>MIF</i>	31
6	Baciloscopía positiva	36
7	Fragmento amplificado del SNP -173 G/C de <i>MIF</i>	38
8	Productos de PCR visualizados en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con AgNO ₃ al 0.2%	39
9	Patrón de bandas generados por digestión con enzima <i>Alu I</i>	40
10	Digestión con <i>Alu I</i>	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Página
1	Clasificación taxonómica de <i>M. leprae</i>	4
2	Comparación entre las características de los genomas de <i>M. leprae</i> y <i>M. tuberculosis</i>	6
3	Genes asociados a lepra replicados en al menos dos poblaciones distintas	12
4	Papel de MIF en las cargas de patógenos intracelulares	22
5	Reactivos y concentración final utilizada en la PCR	32
6	Programa para la PCR para la amplificación del SNP -173 G/C de <i>MIF</i>	32
7	Mezcla de digestión con <i>Alu I</i>	33
8	Patrones de restricción generados por la enzima <i>Alu I</i>	34
9	Características clínicas y demográficas de los pacientes con lepra lepromatosa (LL)	37
10	Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -173 G/C <i>MIF</i> en pacientes y grupo control	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°		Página
1	Forma de consentimiento informado para pacientes y controles	48
2	Encuesta realizada a los pacientes con lepra lepromatosa	50
3	Electroforesis en gel de poliacrilamida	52
4	Tinción de geles de poliacrilamida con AgNO ₃	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: Antes de Cristo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Alu I: *Arthrobacter luteus*

AP-1: Proteína activadora 1

AP-4: Proteína activadora 4

ATP: Adenosín trifosfato

BB: Borderline - Borderline

BL: Borderline - Lepromatoso

BT: Borderline - Tuberculoide

CCDC122: Por sus siglas en inglés
Coiled-coil domain 122

CD: Cúmulo de diferenciación, del inglés
Cluster of differentiation

COX2: Ciclooxygenasa 2

DC: Células dendríticas

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DTH: Reacción de hipersensibilidad retardada, del inglés
delayed-type hypersensitivity

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FL: Fenómeno de Lucio

HLA: Antígenos leucocitarios humanos, del inglés
Human leukocyte antigen

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1, del inglés
Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

IS: Secuencias de inserción, del inglés
insertion sequences

LL: Lepra lepromatosa

LPS: Lipopolisacáridos

LR: Reacción leprosa, del inglés
leprosy reaction

LRRK2: Cinasa 2 rica en repeticiones de leucina, del inglés
leucine-rich repeat kinase 2.

LT- α : Linfotoxina alfa

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno, del inglés
mitogen-activated protein kinases

MB: Multibacilar

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1, del inglés
monocyte chemoattractant protein-1

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés
major histocompatibility complex

MIF: Factor inhibitorio de la migración de macrófagos, del inglés *Macrophage migration inhibitory factor*.

mL: Microlitro

mM: Milimolar

NaCl: Cloruro de sodio

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide*

NF- κ B: Factor nuclear kappa B, del inglés *nuclear factor kappa B*

ng: Nanógramo

NH₄Cl: cloruro de amonio

nm: nanómetro

NOD2: Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos 2, por sus siglas en inglés, *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*

(NH₄)₂CO₃: Carbonato de amonio

OR: Del inglés *Odds Ratio*

pb: Pares de bases

PB: Paucibacilar

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

PGE: Prostaglandina

PLA₂: Fosfolipasa A₂, del inglés *Phospholipase A₂*

PQT: Poliquimioterapia

RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, del inglés *Restriction fragment length polymorphism*

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

SDS: Dodecil sulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate*

STR: Repetición corta en tándem, del inglés *short tandem repeat*

TBE: Tris, borato y EDTA

TLR: Receptor tipo Toll, del inglés *Toll-like receptor*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor necrosis factor alpha*

T1R: Reacción leprosa de tipo 1

T2R: Reacción leprosa de tipo 2

TT: Lepra tuberculoide

VCAM-I: Molécula de adhesión vascular 1, del inglés *vascular cell adhesion molecule 1*

VDR: Receptor de vitamina D, del inglés *vitamin D receptor*

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

RESUMEN

Antecedentes: la lepra es una enfermedad que afecta principalmente a pacientes del Sudeste asiático y Latinoamérica, es causada por el patógeno intracelular *Mycobacterium leprae*. Se manifiesta como uno de dos posibles polos bien definidos o una de tres etapas intermedias e inestables. El polo tuberculoide (TT) se caracteriza por la activación de la respuesta inmune celular contra *M. leprae* acompañada de citocinas inflamatorias como IL-2, TNF- α e IFN- γ , así como muy pocas o nulas bacterias en las lesiones de los pacientes. Por otra parte, en el polo lepromatoso (LL) citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 se encuentran incrementadas mientras que en las lesiones encontramos una elevada carga bacilar, exhibiendo una respuesta inmune humoral que es incapaz de frenar la replicación de la bacteria. Basados en estos perfiles de citocinas, es clara una polarización entre las respuestas Th1 o Th2 que dependen del hospedero. Sin embargo, las respuestas tempranas contra la lepra se encuentran lejos de ser comprendidas debido a que no existe un consenso en los mecanismos centrales que subyacen al espectro de la lepra. El factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF) es un importante desencadenador de la respuesta inflamatoria contra patógenos relacionados como *M. tuberculosis* y contra parásitos que provocan una respuesta inmune similar como *Leishmania* spp. Dos polimorfismos con relevancia clínica han sido reportados en la región promotora del gen humano de *MIF* el STR -794 CATT₅₋₈ y el SNP-173 G/C, este último tiene influencia en el desarrollo de tuberculosis y leishmaniasis. Específicamente, el alelo G está asociado con una respuesta celular más débil y un peor pronóstico. **Objetivo:** determinar la asociación entre el polimorfismo -173 G/C de *MIF* en pacientes con lepra lepromatosa del occidente de México. **Materiales y métodos:** realizamos un estudio de casos y controles en el cual incluimos 111 pacientes del occidente de México con diagnóstico de lepra lepromatosa que acudieron a consulta al Instituto Dermatológico de Jalisco “Dr José Barba Rubio” y 102 sujetos clínicamente sanos como controles. Todos los sujetos estudiados tenían al menos tres generaciones de historia familiar en el occidente de México. La genotipificación del polimorfismo fue hecha mediante PCR-RFLP, usando la enzima de restricción *Alu I*. **Resultados:** la distribución de los genotipos en el grupo control

se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. La frecuencia de los genotipos G/G, G/C y C/C en pacientes con LL fue 50%,44% y 6% respectivamente, mientras que en el grupo control fueron 59%, 34%, 7% respectivamente, no encontramos diferencia estadística significativo entre ambos grupos ($p>0.05$). **Conclusión:** Estos datos sugieren que el polimorfismo -173 G/C de *MIF* no está asociado con el desarrollo de lepra lepromatosa en población mestiza del occidente de México.

Palabras clave: lepra lepromatosa, factor inhibitorio de la migración de macrófagos, occidente de México, polimorfismos, asociación.

ABSTRACT

Background: leprosy is a complex disease that mainly affects patients in South Asia and Latin America that is caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*. It presents as one of either two well-defined poles or three intermediate and unstable stages. The tuberculoid pole (TT) is characterized by the activation of cellular immune response against *M. leprae* accompanied of inflammatory cytokines such as IL-2, TNF- α and IFN- γ , as well as few or absent bacteria in the lesions of patients. On the other hand, in the lepromatous pole (LL) cytokines like IL-4, IL-5 and IL-10 are markedly higher as well as elevated bacillary load in lesions, exhibiting a humoral response that cannot stop the replication of the bacteria. Based on these cytokine profiles, there is a clear polarization according to either Th1 or Th2 responses that depend on the host. However, the early responses to leprosy are far from understood because there is no consensus on the central mechanisms that underlie the leprosy spectrum. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is an important trigger for inflammatory environments effective against related pathogens like *M. tuberculosis* and against parasites that elicit a very similar immune response like *Leishmania* spp. Two polymorphisms of clinical relevance have been reported in the promoter region of the gene for human *MIF*, STR -794 CATT₅₋₈ and the SNP -173 G/C, the second one has influence on the outcome of both tuberculosis and leishmaniasis. Specifically, the G allele is associated with a weaker cellular response and worse prognosis. **Aim:** Determinate the association between the polymorphism -173 G/C of *MIF* and lepromatous leprosy in patients from western Mexico. **Material and methods:** we carried a case and controls study in which we included 111 patients from western Mexico with diagnosis of lepromatous leprosy from Dermatological Institute of Jalisco “Dr José Barba Rubio” and 102 healthy subjects as controls. All subjects reported at least three generations of family history in the western Mexico. The genotyping polymorphism was made by PCR-RFLPs, using the restriction enzyme *Alu I*. **Results:** distribution of genotypes in the control group was within the Hardy-Weinberg equilibrium. We found the frequency of genotypes G/G, G/C and C/C in LL patients were 50%, 44%, were 6% respectively, whereas in the control group were 59%, 34% and 7%, respectively, without finding

statistically significant differences between both groups ($p>0.05$). **Conclusion:** this data suggest that the polymorphism -173 G/C of *MIF* is not associated with developing of lepromatous leprosy in mestizo population from western Mexico.

Keywords: lepromatous leprosy, macrophage migration inhibitory factor, western México, polymorphism, association.

1.-INTRODUCCIÓN

La lepra o enfermedad de Hansen es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*. La micobacteria presenta tropismo por los macrófagos, células dendríticas (DC) y las células de Schwann, lo cual origina una severa afección de la piel y los nervios periféricos, sin embargo también puede afectar distintos tejidos como el sistema retículo endotelial, huesos, articulaciones, membranas mucosas, ojos, testículos y glándulas suprarrenales.

No es claro cómo se adquiere la lepra, aunque las vías respiratorias parecen ser el medio idóneo para que *M. leprae* entre en su hospedero, tampoco se sabe qué factores determinan su desarrollo o el grado de severidad en los pacientes. No obstante se conoce que la respuesta inmune del hospedero hacia el parásito intracelular determina las manifestaciones clínicas de la enfermedad y sus diversas complicaciones. El espectro de la enfermedad se caracteriza por polos bien definidos con características particulares. El polo *tuberculoide* (TT), se caracteriza por un perfil de citocinas de tipo Th1, una marcada inmunidad celular y carga bacilar baja en las lesiones. En el extremo opuesto, el polo *lepromatoso* (LL) se caracteriza por una respuesta inmune de tipo Th2 y elevadas cargas bacilares en las lesiones.

Convencionalmente es aceptado que solo un grupo específico de la población humana es capaz de contraer la infección por *M. leprae*, aunque los mecanismos por los que ocurre esto aún son desconocidos.

La citocina factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) es considerada una pieza central en la respuesta inmune innata contra parásitos intracelulares. La variación en los niveles de expresión de MIF podría asociarse con el tipo de respuesta inmune que los pacientes montan ante distintas infecciones.

El polimorfismo de nucleótido simple (SNP) -173 G/C (rs755622) ubicado en la región del promotor de *MIF* se ha asociado con el incremento en la expresión de MIF, lo que podría contribuir a la activación de una respuesta inmune celular más eficiente contra *M. leprae*.

Con base en lo anterior, se planteó como objetivo determinar la asociación del polimorfismo -173 G/C en *MIF* y el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Genética del Hospedero y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas

El papel de las enfermedades infecciosas ha sido muy importante a lo largo de la historia de la humanidad. Las infecciones ocasionaron una fuerte presión selectiva, aún algunas de ellas siguen siendo graves problemas de salud pública (Sauer et al., 2015). Avances recientes, como el desarrollo de vacunas y antibióticos, además de un aumento general de la educación y nivel socioeconómico ha llevado a incrementar la expectativa de vida, pero no a la erradicación de las enfermedades infecciosas. Para comprender esto, es necesario considerar una compleja relación entre el ambiente microbiano y no microbiano, así como factores humanos genéticos y no-genéticos que determinan la inmunidad contra infecciones o su desarrollo clínico (Casanova & Abel, 2005).

Una característica clásica de las infecciones humanas es que solo una parte de los individuos expuestos desarrollan la enfermedad (Chapman & Hill, 2012). Evidencia acumulada sugiere que los factores genéticos del hospedero juegan un papel importante en la susceptibilidad hacia estas enfermedades (Alcaïs et al., 2009).

2.2.- Lepra o enfermedad de Hansen

La lepra o enfermedad de Hansen, es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*, que principalmente afecta la piel, nervios periféricos, tracto respiratorio superior y ojos (Sasaki et al., 2001) sin embargo, también puede afectar distintos tejidos como el sistema retículo endotelial, huesos, articulaciones, membranas mucosas, ojos, testículos y glándulas suprarrenales (Talhari et al., 2015).

2.2.1.- Aspectos históricos

La lepra ha sido documentada desde la antigüedad por diversas culturas. Desde los papiros egipcios, escritos 4000 años AC, se ha referido a la lepra como una enfermedad que se manifiesta con nódulos en la piel y auto-amputación, a consecuencia de la neuropatía, que ocasiona pérdida sensorial, causada por la infección. Debido el aumento de volumen y rugosidad de la piel, los griegos la

relacionaron con elefantiasis, mientras los árabes la denominaron “*juzam*” que significa edema o hinchazón. A lo largo de la historia la lepra ha sido temida por ser una enfermedad incurable que deriva en severas deformidades y discapacidad, lo que da como resultado una fuerte estigmatización contra los afectados y por lo tanto discriminación pública. La enfermedad de Hansen era considerada un castigo divino en el antiguo testamento en la religión Cristiana y como Karma en el budismo (Muñoz et al., 2013). El término lepra proviene de la palabra en latín *lepros*, que significa deshonor (Modlin, 1994).

2.2.2 Etiología

La enfermedad de Hansen es causada por *M. leprae* un bacilo ácido-alcohol resistente perteneciente a la familia Mycobacteriaceae (Cuadro 1), el cual se caracteriza por ser aerobio inmóvil y no esporulado, con dimensiones que oscilan entre 0.2 a 0.5 µm de ancho por 1 a 8 µm de largo. Tiene predilección por las zonas más frías del cuerpo como piel, nervios, testículos y el tracto respiratorio alto. *M. leprae* posee una pared altamente compleja, con una composición rica en lípidos y macromoléculas como ácidos micólicos y glicolípidos (Bonivento, 2010).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *M. leprae*.

Clase	Schizomycetes
Orden	Actinomycetales
Familia	Mycobacteriaceae
Género	<i>Mycobacterium</i>
Especie	<i>Mycobacterium leprae</i>

(Modificado de Lastória & Abreu, 2014)

La forma de transmisión de *M. leprae* es desconocida, pero probablemente es a través de la propagación de secreciones nasales al igual que *M. tuberculosis* entrando al hospedero mediante las vías respiratorias. La bacteria se acumula principalmente en las extremidades del cuerpo donde reside entre los macrófagos

e infecta las células de Schwann del sistema nervioso periférico. La falta de producción de mielina de las células de Schwann infectadas, y su destrucción por la reacción inmune del hospedero lleva al daño nervioso, pérdida sensorial y las deformidades, marcas características de la enfermedad (Cole et al., 2001)

El periodo de incubación varía entre 3 y 10 años (Pinheiro et al., 2011), los humanos son el principal hospedero de *M. leprae*, aunque se ha observado la infección en armadillos, chimpancés y monos mangabey (Bonivento, 2010).

2.2.2.1 Genoma de *M. leprae* y su evolución reductiva

El genoma completo de *M. leprae* contiene 3,268,203 pares de bases (pb), y posee 57.8% de G+C, estos valores son mucho menores que los reportados para el genoma de *M. tuberculosis* que tiene 4000 genes, 4,411,532 pb y 65.6% de G+C. A partir de una detallada comparación entre ambos genomas se logró identificar que solo el 49.5% del genoma de *M. leprae* contiene genes codificantes, mientras que el 27% corresponde a pseudogenes. El 23.5% restante parece no tener secuencias codificantes y podría corresponder a secuencias reguladoras o genes remanentes que han mutado demasiado como para ser reconocidos. La distribución de los 1,116 pseudogenes es aleatoria, de los 1604 genes activos de *M. leprae*, 1439 son compartidos con *M. tuberculosis* (Cuadro 2). La evolución reduccionista ha sido documentada en parásitos intracelulares obligados como *Richettsia* y *Chlamydia spp.* debido a que los genes se vuelven inactivos una vez que sus funciones ya no son requeridas en nichos altamente especializados (Cole et al., 2001).

Todos los grupos de genes funcionales de *M. leprae* son mucho más pequeños que los presentes en *M. tuberculosis* y otras micobacterias, incluso algunos han desaparecido por completo. Sin embargo, todas las rutas anabólicas principales se encuentran prácticamente intactas, además ha habido una extensa reorganización del repertorio genético para la lipólisis. De igual manera las rutas metabólicas para obtener energía a través de las fuentes comunes de carbono como acetato y galactosa se encuentran dañadas, por lo que no es posible producir adenosín trifosfato (ATP) a partir de la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). Esto implica que *M. leprae* está restringida a crecer en muy

pocas fuentes de carbono y que su catabolismo está severamente limitado (Truman et al., 2011). Debido a esto, el proceso de evolución reductiva ofrece la respuesta a su elevado tiempo de incubación y a por qué actualmente es imposible su cultivo *in vitro* (Schuenemann et al., 2013).

Cuadro 2. Comparación entre las características de los genomas de *M. leprae* y *M. tuberculosis*.

Característica	<i>M. leprae</i>	<i>M. Tuberculosis</i>
Tamaño del genoma (pb)	3268203	4411532
G+C (%)	57.79	65.61
Proteínas codificantes (%)	49.5	90.8
Genes codificantes para proteínas (No)	1609	3.959
Pseudogenes (No)	1116	6*
Densidad de genes (pb por gen)	2037	1114
Promedio en la longitud de los genes (pb)	1011	1012
Promedio en la longitud de genes desconocidos (pb)	338	653

pb: pares de bases, G+C (Guanina más Citosina), No (Número)

*Excluyendo secuencias de inserción (IS)

(Modificado de Cole et al., 2001)

2.2.3.- Clasificación y características de la lepra

Antes de 1943, los casos de lepra se clasificaban según las lesiones cutáneas más evidentes: tuberculosos, maculosos, nerviosos, maculo anestésicos y mixtos. En 1938, Rabello introdujo los conceptos de formas polares y posteriormente, dividió la enfermedad en cuatro tipos: lepromatosa, tuberculoide, dimorfa y casos indeterminados (del Solar et al., 2005)

A partir de 1948 se impuso el concepto sudamericano de polaridad, con dos clases opuestas en características. En el Congreso Internacional de la Lepra, celebrado en Madrid en 1953, se aceptó la clasificación que hasta la fecha se utiliza, empleado los parámetros clínico, baciloscópico, inmunológico e histopatológico. En esta clasificación se incluyeron dos tipos polares: lepromatoso y tuberculoide, así como dos grupos de casos: uno de principio de la lepra denominado caso

indeterminado y casos de inmunología dudosa llamados dimorfos o interpolares. Los tipos polares son estables, mientras que los grupos de casos son inestables (Guerrero et al., 2012).

En 1966, Ridley y Jopling subdividieron el grupo dimorfo según la forma en la que se comporta en el espectro inmunológico: BT (*Borderline tuberculoide*) si se encontraba cerca del polo tuberculoide, BL (*Borderline lepromatoso*) cuando estaba cerca del polo lepromatoso y BB (*Borderline Borderline*) si se localizaba en el centro de este espectro (Ridley & Jopling, 1966).

Los casos denominados indeterminados, son la fase inicial de la lepra, y de acuerdo con la capacidad inmunitaria del individuo afectado se desarrollaran hacia el polo tuberculoide o lepromatoso, aunque con el tratamiento adecuado esta evolución puede interrumpirse (Guerrero et al., 2012).

Por otra parte se encuentran las reacciones leprosas (RL) , que son episodios agudos de inflamación que ocurren durante el curso de la enfermedad (Pinheiro et al., 2011). Se caracterizan por una intensa y repentina activación de la respuesta inmune del hospedero que frecuentemente afecta los nervios periféricos. La RL es una causa común de deficiencias sensoriales y motrices así como de deformidades anatómicas en los pacientes. Existen dos tipos principales de RL: reacción de tipo 1 (T1R) o reacción reversa que ocurre en pacientes BL y BT, y la reacción de tipo 2 (T2R) o eritema nodoso que afecta a pacientes BL y LL. Los pacientes también pueden desarrollar el fenómeno de Lucio (FL) que es conocido como un eritema necrosante o lepra lepromatosa difusa, las reacciones de T1R y T2R muestran perfiles de citocinas similares (Fava et al., 2012).

Para fines terapéuticos, la Organización Mundial de la Salud propuso que los pacientes fueran divididos en dos grupos: paucibacilares (PB) TT, BT y multibacilares (MB) BB, BL y LL. La clasificación se base en el número de lesiones, menor o igual a 5 para paucibacilares y mayor a 5 para multibacilares (Pinheiro et al., 2011)

Con respecto a los aspectos histopatológicos de la lepra, las lesiones en la piel de pacientes con TT se caracterizan por infiltrado inflamatorio que contiene granulomas bien definidos con macrófagos diferenciados, células epitelioides y células gigantes así como células T CD4+ predominantes en el lugar de la lesión, con una baja o nula carga bacilar además de una reacción de Mitsuda positiva. En el otro polo, los pacientes con LL presentan numerosas lesiones en la piel con preponderancia de células T CD8+, no hay formación de granulomas, alta carga bacilar en las lesiones y una epidermis aplanada, así como una reacción de Mitsuda negativa (Pinheiro et al., 2011).

La respuesta de anticuerpos depende de la dicotomía de las células T cooperadoras, lo que está en sincronía con el concepto Th1 y Th2. Así la lepra lepromatosa se encuentra asociada con IL-4, IL-5 y la ausencia de IFN- γ , indicando una polarización hacia Th2, mientras que el polo tuberculoide presenta IFN- γ e IL-2 predominantemente lo que corresponde a un perfil Th1 (Saini et al., 2013).

2.2.4.- Tratamiento

En 1941, Faget en los Estados Unidos fue el primero en utilizar un derivado de Dapsona llamado Promin® intravenosamente para tratar la lepra. Antes de esto los derivados de dapsona habían demostrado ser efectivos contra *M. avium* y *M. tuberculosis*. Años después fue utilizado intramuscularmente en India en 1946, y en 1947, Lowe uso por primera vez la dapsona por vía oral en Nigeria. Desde 1950 se convirtió en el pilar del tratamiento contra la lepra. En 1960, las recaídas de los pacientes se volvieron un problema común, incluso después de un tratamiento prolongado con dapsona, razón por la cual aparecieron nuevas drogas contra *M. leprae* como rifampicina y clofazimina de Lampren®. La rifampicina es extremadamente efectiva ya que elimina al 99.9% de los bacilos de Hansen con una sola dosis de 600mg, pero los pacientes con lepra pueden albergar $10^{12} - 10^{13}$ micobacterias, por lo tanto el tratamiento suele ser prolongado, desafortunadamente la resistencia a este fármaco se desarrolla rápidamente, mientras que la resistencia a la clofazimina suele ser rara (Naafs, 2006).

La Organización Mundial de la Salud (*WHO* por sus siglas en inglés, 1981) recomendó que todos los pacientes debían recibir un tratamiento de poliquimioterapia compuesto por estos 3 medicamentos: rifampicina, dapsona y clofazimina. Para pacientes PB, el tratamiento requería una dosis de 600 mg de rifampicina una vez al mes y 100 mg de dapsona diariamente durante 6 meses. Los pacientes MB requerían una dosis de 300 mg de clofazimina añadidos a la rifampicina una vez al mes y 50 mg de clofazimina diariamente añadida a la dapsona, durante 24 meses, hasta que el índice bacteriológico diera negativo (*WHO*, 1982). Posteriormente los tiempos de tratamiento cambiaron debido al número de recaídas en los afectados, pacientes PB 6-9 meses y pacientes MB 24-36. Estos periodos probaron ser más eficaces, las recaídas se volvieron raras con un 1.09% en pacientes PB y 0.74% en pacientes MB. El número de casos disminuyó de 5 millones a un poco más de 800,000 en el año 2000, es decir una reducción del 85%, razón por la cual se creyó que la lepra podía ser curada y erradicada (Naafs, 2006).

En 1991, la *WHO* emitió una resolución en la que se planteaba como meta la eliminación de la lepra como un problema de salud pública para el año 2000, en la cual la “eliminación” consistía en reducir la prevalencia a menos de 1 caso por cada 100,000 habitantes (*WHO*, 1991). Sin embargo, la lepra no fue eliminada y la transmisión continuó, lamentablemente debido al uso de la palabra eliminación se creó una percepción errónea de la situación real dando como resultado una drástica reducción de recursos destinados a su investigación y control (Rodrigues & Lockwood, 2011).

2.2.5 Epidemiología

Existen dudas acerca de si la lepra se originó en Asia o África, aunque análisis de ADN de diferentes cepas sugieren que la micobacteria se originó en África (Rodrigues & Lockwood, 2011). Se cree que fue introducida en Europa cuando las tropas de Alejandro Magno regresaban de India en el año 300 AC. Su incidencia fue elevada en Europa durante la Edad Media, sin embargo el número de casos disminuyó dramáticamente en 1870 debido al desarrollo socioeconómico. La lepra

fue introducida en Latinoamérica durante la colonización francesa a Estados Unidos y por españoles y portugueses en Sudamérica (Lastória & Abreu, 2014).

La lepra es endémica en países tropicales, especialmente en países poco desarrollados o en vías de desarrollo. Su prevalencia ha disminuido desde la introducción de la poliquimioterapia (PQT) a inicios de los 80's. En 2011 la *WHO* recibió reportes de la enfermedad en 105 países, ubicados principalmente en el sureste de Asia, América, África, Pacífico Oriental y el Occidente del Mediterráneo. Durante ese mismo año, 219,075 nuevos casos fueron detectados en el mundo. En el primer cuarto de 2012, existía una prevalencia 181,941 casos registrados con una prevalencia de 0.34 casos por cada 10,000 habitantes (*WHO*, 2012). Según datos de la Dirección General de Epidemiología (DGE, 2014) en México se reportaron 169 casos nuevos de los cuales 10 estados concentran el 79.8% de los casos, entre los que destacan Jalisco, Michoacán, Colima y Nayarit por pertenecer a la región occidental del país.

Por esta razón se ha incluido a la lepra en la lista de las enfermedades tropicales ignoradas, las cuales proliferan entre las poblaciones más marginadas afectando a más de mil millones de personas alrededor del mundo, costando miles de millones de dólares en servicios de salud a los países en vías de desarrollo (Feasey et al., 2010).

2.2.6 Genética de la lepra

Convencionalmente es aceptado que solo un grupo específico de la población humana es capaz de contraer la infección por *M. leprae* a pesar de la gran susceptibilidad de los humanos hacia otros miembros de la familia *Mycobacteriaceae*. También se tiene la creencia de que la mayoría de los humanos son inmunes a la lepra, aunque los mecanismos por los que esto ocurre aún son desconocidos (Joyce, 2012).

Se sabe que la exposición a *M. leprae* es necesaria, pero no suficiente por sí misma, para adquirir la infección (Sauer et al., 2015). La transmisión requiere un patógeno y suficiente inóculo transferido a un hospedero susceptible por el tiempo necesario para la incubación de *M. leprae* (Joyce, 2012).

La fuente primaria de transmisión es el contacto entre humanos. Los hogares de los pacientes con lepra han sido considerados el lugar idóneo para la propagación de la infección, razón por la cual se ha prestado particular atención a los contactos familiares, debido a las similitudes genéticas y a la prolongada convivencia entre ellos. La relación entre cónyuges, se vuelve sumamente interesante, por el prolongado tiempo de contacto íntimo ya que un paciente lepromatoso sin tratamiento libera millones de bacilos diariamente, lo que permite la transmisión del patógeno hacia la pareja. Sin embargo la tasa de transmisión entre cónyuges es menor que la encontrada en otras personas que viven en la misma casa (Joyce, 2012). Adicionalmente las tasas de concordancia de la enfermedad y sus formas clínicas son mayores entre gemelos monocigóticos comparados con dicigóticos (Sauer et al., 2015).

Los resultados anteriores sugieren la existencia de un fuerte componente genético, responsable de controlar la susceptibilidad a la lepra, aunque no proveen ninguna información sobre la naturaleza de los factores genéticos involucrados. Estudios previos han descrito regiones cromosómicas y genes candidatos para ser considerados como factores de riesgo en el desarrollo de lepra, por ejemplo: MHC/HLA clase I y II, *TNF α* , *LT- α* , *MICA*, *MICB*, así como genes que no pertenecen al HLA, tales como *CCDC122*, *IFN γ* , *IL-10*, *IL-12 β* , *IL-23R*, *KIR*, *LACC1* (anteriormente *C13 orf31*), *LT- α 4H*, *LRRK2*, *MRC1*, *NOD2*, *PARK2/PACRG*, *RIPK2*, *SLC11A1* (anteriormente *NRAMP1*), *TAP*, *TLR*, *TNFSF15*, and *VDR*. Aunque pocos han sido replicados exitosamente por grupos de estudio independientes (Cuadro 3), por lo que estudios moleculares adicionales a los ya existentes son necesarios (Sauer et al., 2015).

Cuadro 3. Genes asociados a lepra replicados en al menos dos poblaciones distintas.

Símbolo oficial	Nombre completo oficial	Función
<i>HLA-DRB1</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DRB1	Heterotrímero anclado en la membrana, presenta antígenos peptídicos de origen extra celular, origen CD8 + células T
<i>TNF-α</i>	Factor de necrosis tumoral α	Citocina proinflamatoria
<i>LT-α</i>	Linfotoxina α	Citocina proinflamatoria
<i>IL-10</i>	Interleucina 10	Citocina antiinflamatoria
<i>PARK2</i>	Proteína Parkinson 2, E3 proteína ubiquitina ligasa	Ligasa ubiquitina E3
<i>NOD2</i>	Dominio de oligomerización de unión a nucleótido 2	Receptor citoplasmático con un papel en la respuesta inmune contra lipopolisacáridos bacterianos
<i>RIPK2</i>	Receptor de interacción serina-treonina-quinasa 2	Miembro de la familia RIP, quinasa proteína de treonina/serina
<i>LACC1</i>	Lacasa (oxidorreductasa multicobre)	Desconocido
<i>CCDC122</i>	Por sus siglas en inglés <i>Coiled-coil domain 122</i>	Desconocido

(Modificado de Sauer *et al.*, 2015)

Con base en esto, la lepra representa un modelo idóneo para el estudio de la predisposición genética a infecciones. *M. leprae*, el agente etiológico de la lepra posee una limitada variabilidad entre cepas de diferentes regiones geográficas (Busso et al., 2011), esta característica en conjunto con el amplio rango de manifestaciones clínicas, sugiere que la variabilidad de la enfermedad así como la susceptibilidad a desarrollarla es dependiente de factores genéticos del hospedero (Figura 1) (Sauer et al., 2015).

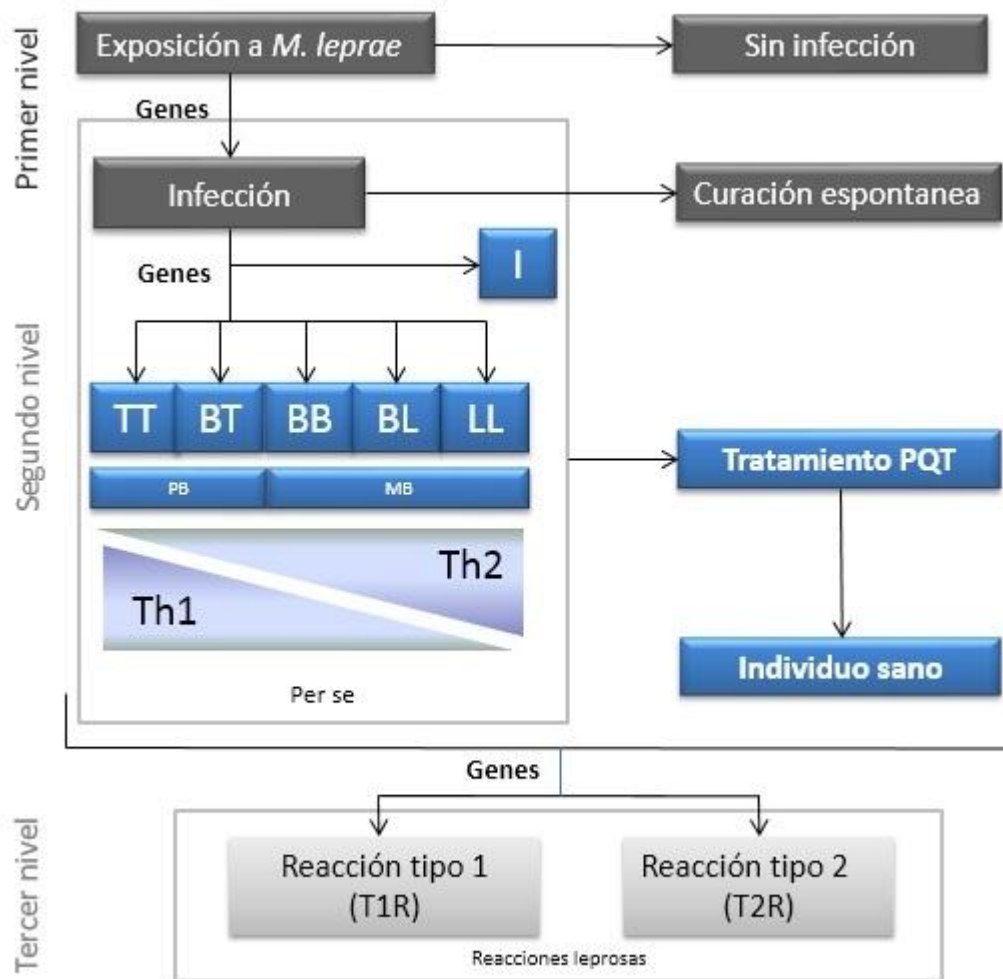


Figura 1.- Modelo esquemático de susceptibilidad genética a la lepra (Modificado de Sauer et al., 2015). La exposición a *M. leprae* no siempre resulta en el desarrollo de lepra. En un estado inicial, un primer grupo de genes confiere susceptibilidad a la infección. Entre los individuos que desarrollan la enfermedad, un segundo grupo de genes determina el tipo de respuesta inmune

del hospedero y subsecuentemente el subtipo de lepra. Finalmente, un tercer grupo de genes confiere riesgo a desarrollar reacciones leprosas. TT: Tuberculoide-tuberculoide, BT: Borderline-tuberculoide, BB: Borderline-Borderline, BL: Borderline-lepromatoso, LL: Lepromatoso-lepromatoso, I: Indeterminado, PB: Paucibacilares, MB: Multibacilares, Th1: del inglés T-helper 1, Th2: T-helper 2, PQT: poliquimioterapia.

2.3.- Factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF)

MIF es una proteína multifuncional codificada por el gen *MIF*. Fue descubierta en 1966 (David, 1966; Bloom & Bennett, 1966) como un factor derivado de las células T activadas que inhibía la migración aleatoria de los macrófagos *in vitro* fuera de tubos capilares. Posteriormente al hacer una caracterización clonal y bioquímica, MIF fue redefinida como una citocina pleiotrópica con un papel central en la inmunidad fisiológica así como en enfermedades inflamatorias, cáncer e infecciones (Tillmann et al., 2013; Das et al., 2013).

2.3.1 Estructura y función

La proteína MIF tiene un peso molecular de 12.5kDa, se presenta como un homotrímero formado por monómeros de 115 aminoácidos, cada uno constituido de dos hélices-alfa y cuatro láminas-beta plegadas. Entre las subunidades existe un sitio enzimático con un sustrato desconocido y que presuntamente tiene actividad tautomerasa/isomerasa (Figura 3) (Krivokuća et al., 2015).

Diversos tipos celulares son capaces de secretar MIF constitutivamente, por ejemplo las células T activadas y los macrófagos, con un papel central en la activación de la respuesta inflamatoria, reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH) y angiogénesis. Los niveles de MIF regulan el efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides, potencializan la fagocitosis y la producción de H₂O₂ en macrófagos, además llevan a cabo una función sinérgica con IFN- γ para producir NO. Los macrófagos deficientes en MIF muestran una respuesta pro inflamatoria dañada, la cual ha sido atribuida a una menor expresión de TLR-4, y una activación disminuida de NF- κ B, favoreciendo la apoptosis. MIF es secretada a partir de repositorios intracelulares preformados, y su expresión es inducida por diversos estímulos incluyendo estrés oxidativo, citocinas e infección (Malu et al., 2011). MIF es fundamental en la respuesta inmune innata contra diversos parásitos

responsables de enfermedades como malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis (de Dios & Rodriguez-Sosa, 2011) todos ellos parásitos intracelulares al igual que *M. leprae*.

Adicionalmente, diversos reportes demuestran que MIF se expresa en una gran variedad de células diferentes a las del sistema inmune, como epiteliales y endoteliales. Esto sugiere que MIF se encuentra involucrado en diversos procesos fisiológicos y patofisiológicos (Figura 2) (Nishihira, 2012).

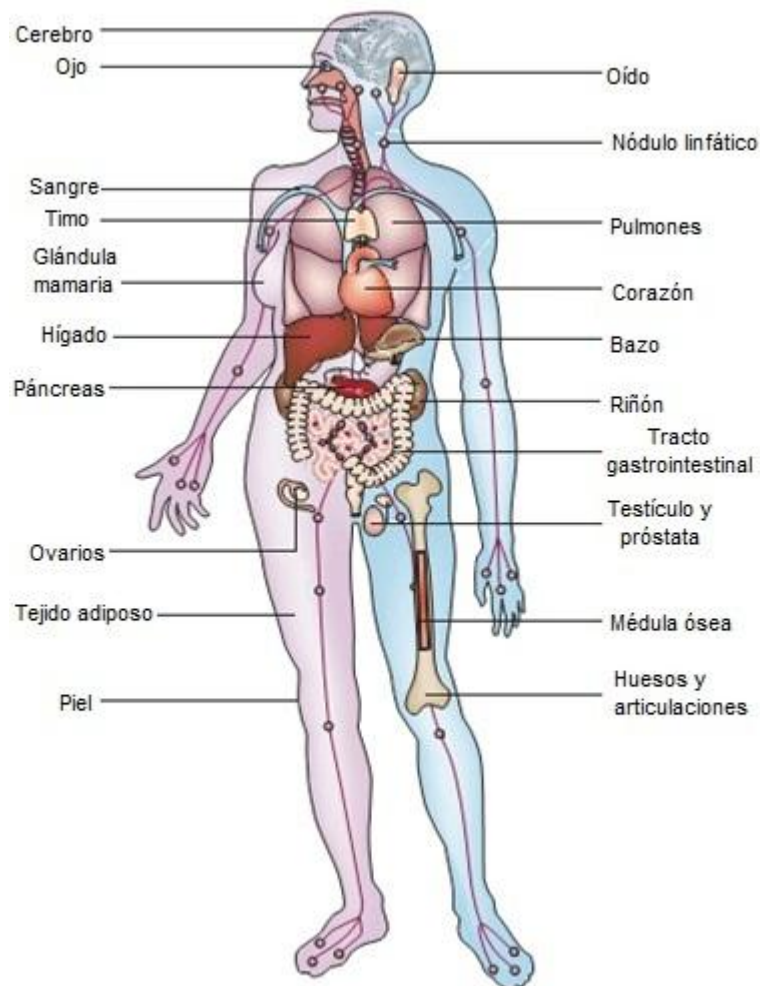


Figura 2.- Patrones de expresión de MIF (Modificado de Calandra & Roger, 2003). Distribución de tejidos y fuentes celulares del factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF).

Una vez secretada, MIF exhibe un amplio rango de actividades inmunes e inflamatorias, incluyendo la inducción de citocinas inflamatorias como

TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12, IL-16 y CXCL8 (IL-8). MIF favorece la expresión del gen TLR4, que codifica la señal de traducción del complejo receptor de lipopolisacáridos (LPS), a través de la activación de factores transcripcionales de la familia ETS. Mantiene las funciones proinflamatorias de los macrófagos inhibiendo p53. Adicionalmente promueve la migración y el reclutamiento de células inmunes induciendo la expresión de quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y moléculas de adhesión como (I-CAM)-1 y (V-CAM)-1 (de Dios & Rodríguez-Sosa, 2011).

MIF es una citocina tipo-quimiocina debido a que no presenta cisteínas en su extremo amino terminal, razón por la cual no encaja estructuralmente en las 4 familias de quimiocinas bien definidas. A pesar de esto, comparte muchas características con ellas ya que regula el reclutamiento de monocitos, células T, neutrófilos, células progenitoras endoteliales y células oncogénicas (Tillmann et al., 2013).

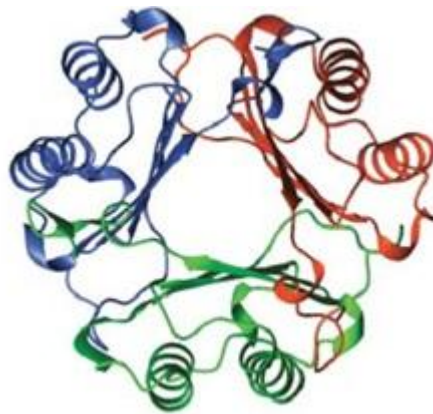


Figura 3.- Estructura tridimensional de MIF (Calandra & Roger 2003). Homotrímero formado por monómeros de 115 aminoácidos, cada uno constituido de dos hélices-alfa y cuatro láminas-beta plegadas. Entre las subunidades hay un sitio enzimático con un sustrato desconocido y que presuntamente tiene una actividad tautomerasa/isomerasa.

2.3.1.1 MIF y procesos inflamatorios

Las infecciones por parásitos son importantes causas de morbilidad y mortalidad en humanos, por lo que las respuestas inmunes innata y adaptativa son cruciales para determinar su evolución. Factores asociados al parásito y componentes derivados del hospedero son importantes moduladores de la inflamación. En este contexto MIF es sobre-expresada en la mayoría de las infecciones, sin embargo el papel de MIF en la respuesta inmune contra parásitos ha sido notado recientemente y mucha de la información aún debe ser analizada y comprendida (de Dios & Rodriguez-Sosa 2011).

Normalmente los niveles circulantes de MIF son de 2-10 ng/mL en plasma humano, sin embargo presentan oscilaciones diurnas que parecen reflejar un control neuroendocrino. Las concentraciones de MIF en plasma pueden elevarse en diferentes desordenes inflamatorios. La primera evidencia de que MIF podría estar involucrada en procesos infecciosos y sepsis, además de funcionar como un biomarcador fue proporcionada por Bernhagen et al. (1993), quienes describieron a MIF como una proteína secretada por la glándula pituitaria después de una estimulación con LPS. Posteriormente, los macrófagos activados y otros tipos celulares demostraron ser grandes productores de MIF en respuesta a una activación inflamatoria (Bernhagen et al., 1993). Calandra et al. (2003) proporcionaron evidencia del papel de MIF en sepsis, demostraron la presencia de elevadas concentraciones de MIF circulante en pacientes con este padecimiento y niveles aun superiores en los sujetos con shock séptico. En un estudio posterior hecho por Lehmann et al. (2001) examinaron MIF en pacientes con sepsis y con enfermedad post quirúrgica, un incremento en MIF pudo ser observado en ambos grupos con respecto a individuos sanos. Con base en lo anterior MIF aparece como un biomarcador para enfermedad crítica, aunque no lo suficiente específico para diferenciar entre inflamación causada por un proceso infeccioso o no infeccioso (Grieb et al., 2010).

En enfermedades infecciosas, existen reportes en poblaciones africanas y caucásicas de asociación entre la expresión de altos niveles de MIF y una mejora

en pacientes con neumonía y meningitis meningocócica, en contraste con un tipo de malaria más agresiva, lo que podría indicar que la influencia de MIF en la severidad de las enfermedades infecciosas depende en particular del patógeno. Estudios experimentales en modelo murino sugieren que niveles elevados de MIF contribuyen a evitar la infección de macrófagos por *M. tuberculosis* y *M. bovis in vitro* (Das et al., 2013).

2.3.2 Vía de acción de MIF

2.3.2.1 Activación de la vía de señalización ERK1-ERK2

MIF se une a un receptor de superficie celular constituido por CD74 asociado con moléculas MHC de clase II y CD44 (Krivokuća et al., 2015; Zheng et al., 2012). Estudios en fibroblastos quiescentes estimulados con MIF muestran que esta proteína induce una rápida (30 minutos) y sostenida (24 horas) fosforilación de la vía de señalización ERK1-ERK2-MAPK así como favorece la proliferación celular. Este mecanismo es dependiente de la cinasa A y asociado a un incremento en la actividad enzimática de la fosfolipasa A2 (PLA2). PLA2 es un importante enlace en la activación de la cascada proinflamatoria, resultando en la producción de ácido araquidónico y posteriormente en prostaglandinas y leucotrienos (Bloom & Al-Abed 2014).

2.3.2.2 Expresión de TLR4

La expresión constitutiva de una citocina por macrófagos es poco usual, por lo que surge la siguiente pregunta ¿Qué ventaja brinda la expresión de MIF a los macrófagos? Reportes indican que macrófagos de ratón deficientes en MIF tienen una menor respuesta a LPS y bacterias Gram-negativas, pero no a otros estímulos, como la reducción en la producción de citocinas debido a una disminución en la expresión de TLR4 (Zheng et al., 2012). MIF favorece una sobreexpresión de TLR4 al actuar sobre la familia de factores transcripcionales ETS, incluyendo PU.1 (Bloom & Al-Abed 2014). Por lo tanto MIF facilita la detección de endotoxinas y componentes bacterianos, permitiendo que las células que se encuentran en primer plano del sistema inmune del hospedero, como los macrófagos, puedan responder rápidamente a la infección (Koff et al., 2013). Una rápida producción de citocinas pro-inflamatorias es esencial para activar la respuesta inmune. Estudios en ratones

deficientes en MIF han demostrado que estos son incapaces de controlar la infección por *Salmonella typhimurium*. El aumento en la susceptibilidad a la infección está asociado con la reducción en los niveles en plasma de TNF- α , IL-12 e IFN- γ pero no con óxido nítrico (NO) y con mayores conteos bacterianos en comparación con el ratón de tipo silvestre. En conjunto esto indica que MIF promueve una respuesta inmune del tipo Th1 en la infección contra *S. typhimurium* (Calandra & Roger 2003).

2.3.2.3 MIF suprime la activación de p53

Tumores primarios y diversas líneas celulares oncogénicas expresan grandes cantidades de MIF. Reportes previos indican que MIF funciona como un regulador negativo de la apoptosis y del arresto celular mediado por p53, dando origen a un enlace entre MIF, inflamación, crecimiento celular y tumorigénesis (Marvast et al., 2011; Zheng et al., 2012). Estudios anteriores encontraron que la función proinflamatoria en macrófagos deficientes en MIF se encuentra disminuida en comparación con ratones silvestres después de que ambos son sometidos a un estímulo con LPS. A pesar de que los niveles de NO no variaron entre los macrófagos de ambos grupos, se cree que NO es un importante mediador de la apoptosis en macrófagos deficientes para MIF y estimulados con LPS. Adicionalmente se encontró que MIF inhibe la acumulación intracelular de p53 inducida por NO y por lo tanto regula la apoptosis. La inhibición de p53 a través de MIF requiere una activación consecutiva de ERK1/ERK2, PLA2, ciclooxigenasa 2 (COX2) y PGE₂ (Calandra & Roger 2003). Otro estudio reporta una interacción de MIF en la vía E2F-p53 para mantener un crecimiento celular normal o maligno. La sobreexpresión de TLR4 y una prolongada supervivencia celular son dos mecanismos por los cuales MIF promueve una respuesta inmune innata pro inflamatoria (Chatterjee et al., 2014).

2.3.3 Estructura del gen de *MIF*

Existe solo un gen de *MIF* en el genoma humano, localizado en el cromosoma 22 (22q11.2), compuesto por tres exones cortos de 172, 107 y 66 pares de bases, además de dos intrones de 188 y 94 pares de bases (Figura 4). Su región reguladora 5' contiene numerosas secuencias consenso para la unión de factores de la transcripción, como la proteína activadora 1 (AP-1) (Calandra & Roger 2003). Todos los mamíferos comparten un 90% de homología en este gen. Sorpresivamente, *MIF* parece no pertenecer a ninguna superfamilia de citocinas. Homólogos de esta proteína han sido encontrados en pollos, peces sin mandíbula, peces mandibulados, garrapatas, parásitos, plantas (*Arabidopsis thaliana*) y cianobacterias. La conservación de *MIF* entre las distintas especies indica un importante papel en funciones biológicas. Dentro del genoma humano existe un gen que tiene una elevada homología con *MIF*, el *DDT* correspondiente a la D-dopacromo tautomerara. Ambos genes se encuentran localizados relativamente cerca en el cromosoma 22, lo que podría indicar que *MIF* y *DDT* son duplicaciones de un gen ancestral que ha evolucionado para tener diferentes funciones biológicas (Calandra & Roger 2003).

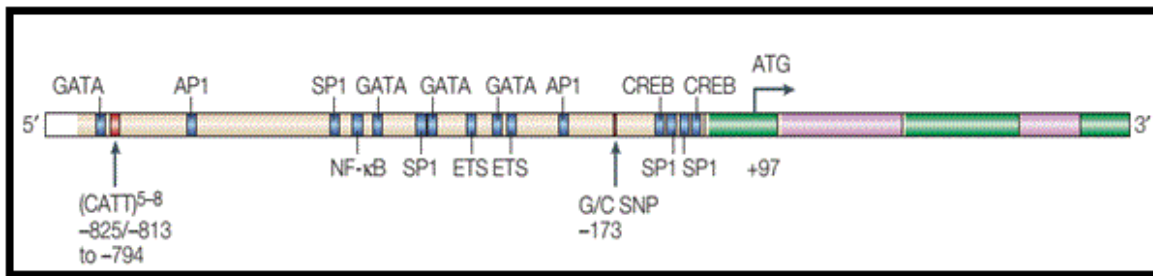


Figura 4.- Estructura del gen *MIF* (Calandra & Roger 2003). Estructura del gen señalando con colores las regiones de interés en dirección 5'. Azul: sitios de unión para factores de transcripción, rojo: polimorfismos STR -794 (CATT) y SNP-173 (G/C), verde: exones, rosa: intrones.

2.3.4 Polimorfismos en la región promotora de *MIF*

Se han identificado dos polimorfismos en el gen *MIF*, uno de repeticiones cortas en *tándem* (STR) CATT presente de cinco a ocho veces en la posición -794 y un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) G/C en la posición -173 (Koff et al., 2013). En 2001, Donn y colaboradores identificaron que la transición de G a C en el

SNP-173 introduce un sitio de unión para la proteína activadora 4 (AP-4) que actúa como un factor transcripcional, aumentando la expresión de MIF (Donn et al., 2001). Ambos han sido asociados con la severidad de la artritis reumatoide y la artritis idiopática juvenil (Calandra & Roger 2003).

2.3.5 MIF en enfermedades infecciosas

Estudios posteriores de epidemiología genética han encontrado que la presencia de los alelos de alta expresión de MIF está asociada con una respuesta inmune innata más eficaz. La distribución de los alelos de *MIF* es útil para identificar la estratificación de las poblaciones. Entre los habitantes del África sub-sahariana predominan las variantes alélicas de baja expresión de MIF, lo que confiere protección contra las complicaciones inflamatorias causadas por la malaria, ya que históricamente esta región sufre de grandes tasas de mortalidad debido a esta infección. Estudios en ratones han demostrado el papel benéfico de suprimir MIF ante una anemia severa causada por malaria. Posteriormente un estudio en 643 niños de Kenia demostró que aquellos que portaban alelos de baja expresión de MIF eran menos propensos a desarrollar anemia severa como resultado de la infección por malaria (Cuadro 4) (Grieb et al., 2010).

Diversos reportes centrados en la influencia de MIF en enfermedades autoinmunes o infecciosas como la malaria, donde las complicaciones inflamatorias suelen ser letales, han reportado una menor prevalencia de los alelos de alta expresión de MIF. En conjunto los datos anteriores resaltan el papel central de la inmunidad innata contra patógenos y apoyan la conclusión de que los alelos de *MIF* se encuentran en un balance que se ha mantenido debido a la presión selectiva contra diferentes infecciones a lo largo de distintas poblaciones. El descubrimiento de alelos funcionales en *MIF* y su asociación con diferentes patologías ha provocado que los estudios se centren en comprender cuál es el papel de esta citocina en la inmunopatogénesis y en enfoques farmacogenómicos para regular las vías de señalización dependientes de ella. Los genes polimórficos constituyen una importante base para la variación en la respuesta inmune del hospedero (Bucala, 2013).

Cuadro 4.- Papel de MIF en las cargas de patógenos intracelulares.

Patógeno intracelular	Sistema experimental para la manipulación de MIF	Efectos de MIF en niveles parasitarios	Mecanismos inmunes
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ratones, anti-MIF	↑	MIF inhibe la secreción de IL-10, citocina que reduce los niveles de parásitos
<i>Salmonella enterica</i>	Ratones Mif -/-	↓	MIF promueve una respuesta Th1 y disminuye la expresión de NO, el cual tiene un papel supresor
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Macrófagos humanos, anti-MIF, rMIF	↓	MIF incrementa la activación de macrófagos
<i>Leishmania major</i>	Macrófagos de raton, anti-MIF, rMIF		MIF incrementa la activación de macrófagos a través de una potencialización de TNF y la producción de NO.
	Ratones Mif -/-	↓	MIF reduce el tamaño de las lesiones y parcialmente regula el efecto leishmanicida de IFN- γ en macrófagos pero no altera la polarización Th1
<i>Toxoplasma gondii</i>	Ratones Mif -/-	↓	MIF estimula la producción de IL-1 β , IL-12, TNF, NO, IFN- γ y promueve la maduración de DC
<i>Tripanosoma cruzi</i>	Ratones Mif -/-	↓	MIF estimula la producción de IL-1 β , IL-12, IL-18, polarización Th1 y producción de IgG2a
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Ratones Mif -/-	=	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	Voluntarios humanos; correlación	=	-
	Niños infectados en zonas endémicas; correlación	↓	-

(Modificado de Bucala, 2012)

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La lepra lepromatosa se encuentra asociada con un perfil de citocinas del tipo Th2, como IL-4, IL-5 y la ausencia de IFN- γ , favoreciendo una respuesta inmune de tipo humoral incapaz de controlar la infección por *M. leprae*.

MIF es una citocina que desempeña un papel central en la activación de la respuesta inmune innata, se encuentra elevada en numerosas enfermedades infecciosas con la finalidad de evitar la infección de los macrófagos por diversos patógenos responsables de enfermedades como malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, toxoplasmosis, neumonía, meningitis meningocócica y micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, ya que favorece la expresión de un perfil de citocinas Th1, activando una respuesta inmune de tipo celular para tratar de controlar la infección.

Existen reportes previos que asocian la presencia del SNP -173 G/C de *MIF* con niveles elevados de la citocina, lo que favorece una respuesta inmune celular adecuada por parte del individuo afectado, esto podría contribuir a controlar la infección por *M. leprae*.

Sin embargo, se desconoce si existe una asociación entre este polimorfismo y el desarrollo de lepra lepromatosa.

4.- HIPÓTESIS

Existe asociación entre la presencia del polimorfismo SNP-173 G/C del gen *MIF* con el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México.

5.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general

- Identificar la asociación entre el polimorfismo -173 G/C en el gen *MIF* y el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México.

5.2.- Objetivos particulares

1. Determinar la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -173 G/C de *MIF* en pacientes con lepra lepromatosa y sujetos clínicamente sanos del occidente de México
2. Determinar la asociación entre el polimorfismo -173 G/C de *MIF* y el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes del occidente de México

6.- DISEÑO METODOLÓGICO

6.1.- Tipo de estudio

- Observacional de casos y controles

6.2.- Sedes de estudio

- Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología (CIINDE), Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara
- Instituto Dermatológico de Jalisco “Dr. José Barba Rubio”

6.3.- Consideraciones éticas y de bioseguridad

El consentimiento informado por escrito se obtuvo de todos los pacientes antes de la inclusión al estudio (Anexo 1), de acuerdo a las normas éticas establecidas en la declaración de Helsinki del 2008 (Puri et al., 2009). Una vez aceptada su participación en el estudio se les realizó una encuesta para conocer datos clínicos y demográficos (Anexo 2). La disposición de los residuos peligrosos biológicos infecciosos se llevó a cabo de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

6.4 Universo de estudio

Pacientes que acuden a la consulta del Instituto Dermatológico de Jalisco “Dr. José Barba Rubio”, con diagnóstico clínico e histopatológico de lepra lepromatosa, de acuerdo a la clasificación propuesta por Ridley y Jopling (1966) e individuos clínicamente sanos.

6.5 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue elegido con base al número de muestras de pacientes en el banco de ADN del CIINDE (Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología) y a la frecuencia de pacientes que acuden a consulta al Instituto Dermatológico por este padecimiento.

111 pacientes con diagnóstico de lepra lepromatosa y 102 individuos clínicamente sanos, pareados en edad y género con los pacientes.

6.6 Periodo de estudio

Junio del 2014 a Mayo del 2015

6.7 Criterios de selección

6.7.1.- Criterios de inclusión

Grupo de estudio:

- Pacientes con diagnóstico de lepra lepromatosa
- Mayores de 18 años
- Ambos géneros
- Que hayan aceptado participar de manera voluntaria

Grupo control:

- Individuos clínicamente sanos
- Mayores de 18 años
- Ambos géneros
- No relacionados con los pacientes
- Que hayan aceptado participar de manera voluntaria

Todos los grupos:

- Originarios del occidente de México con al menos tres generaciones anteriores
- Firmar el consentimiento informado por escrito (Anexo 1)

6.7.2.- Criterios de exclusión

- Muestra sanguínea insuficiente
- Degradación del ADNg
- Muestras de ADNg con una concentración menor a 40 ng/ μ L o una relación DO260/DO280 menor a 1.6, considerando una relación adecuada de 1.8-2.0
- Los que decidan retirarse por voluntad propia

6.7.3.- Criterios de no inclusión

- Historial de enfermedades crónico degenerativas
- Proceso infeccioso o inflamatorio agudo o crónico en el momento de la toma de la muestra

6.8 Criterios de interpretación

Polimorfismo -173 G/C en el gen *MIF*

<i>Genotipo</i>	Número de bandas	Tamaño en pb*
<i>G/G</i>	2	268 y 98
<i>G/C</i>	4	268, 206, 98 y 62
<i>C/C</i>	3	206, 98 y 62

*pares de bases

6.9 Variables

6.9.1 Dependientes

Genotipos del polimorfismo -173 G/C en el gen *MIF*

6.9.2 Independientes

Polimorfismo -173 G/C en el gen *MIF*

6.10.- Métodos

6.10.1.- Análisis molecular

Con la finalidad de poder identificar el polimorfismo -173 G/C en el gen *MIF* se procedió a extraer el ADNg a partir de sangre periférica.

6.10.1.1 Toma de muestras sanguíneas de controles y pacientes con lepra lepromatosa

Se tomaron 10 mL de sangre periférica del grupo control (n=102) y de pacientes (n=111). Las muestras fueron obtenidas a través de punción venosa y recolectadas en tubos Vacutainer® adicionados con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La sangre fue almacenada a 4°C hasta su uso por un periodo máximo de una semana.

6.10.1.2 Extracción de ADNg

El proceso fue llevado a cabo mediante la técnica modificada de *Salting out* (Miller et al., 1988). Los 10 mL de sangre se colocaron en un tubo cónico de 50 mL, posteriormente se añadieron 40 mL de una solución hipotónica para lisar eritrocitos (siempre usar fría), compuesta por cloruro de amonio (NH_4Cl) y carbonato de amonio ($\text{NH}_4\text{}_2\text{CO}_3$), ambos disueltos en agua destilada. La mezcla se homogenizó por inversión y se dejó reposar 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm en la centrifuga Beckman® modelo TJ-6 durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó en cloro al 5.25% y al botón de células se añadieron 3 mL de solución para lisar eritrocitos, teniendo cuidado de no depositar la solución directamente sobre el botón celular sino que resbalara por el tubo cónico, suavemente se realizaron lavados superficiales para tratar de eliminar los eritrocitos restantes, nuevamente el sobrenadante es desechado. El botón celular se desprendió del tubo con unos pequeños golpes. Se añadieron en el tubo con el botón 20 mL de solución para lisar eritrocitos y se volvieron a centrifugar por 15 minutos a 15,000 rpm. Estos lavados se repitieron 3 veces para obtener un botón de leucocitos (color blanco) libre de eritrocitos.

El botón de leucocitos se desprendió y se le añadieron 3 mL de solución para lisar leucocitos (siempre usar fría), compuesta por Trizma base (Tris) 10mM, cloruro de sodio (NaCl) 400mM y la sal Na_2EDTA 2mM. Posteriormente se añaden 200 mL de dodecilsulfato sódico al 1% (SDS) y 500 μL de proteinasa K 2mg/mL, la mezcla se agitó en vortex hasta disolver el botón y se dejó en baño María a 37°C por un periodo de 48 horas.

Transcurrido este periodo se añadió 1 mL de solución saturada de NaCl 5 M y se centrifugó 15 minutos a 15000rpm. Se tomó el sobrenadante (importante no tocar el sedimento) y se depositó en un tubo de 15 mL al cual se añadió etanol frío al 100% para precipitar el ADN, se dejó reposar 2 minutos a temperatura ambiente.

El tubo con el ADN y el alcohol se agitó por inversión 1 minuto para compactar la hebra con el material genético. La hebra se depositó en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm en la centrifuga

Sorvall® Biofuge fresco durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se volvió a añadir 1 mL de alcohol al 70% para repetir el proceso. Se realizaron 3 lavados de cada muestra. Al finalizar el último lavado, se decantó el sobrenadante y se dejó el tubo con la hebra compactada (tapado con una gasa) a 37°C durante 24 horas para evaporar los remanentes de etanol (no exceder las 24 horas). Transcurrido este proceso el ADN fue reconstituido en 1 mL de agua inyectable. Se mezcló manualmente hasta homogenizar y las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

6.10.1.3.- Cuantificación de ADN

Para determinar la concentración y pureza de ADN en cada una de las muestras se utilizó el equipo NanoDrop 2000® de la marca Thermo Scientific®. Se determinó la absorbancia en las longitudes de onda de 260/280 nm. La concentración de ADN se tomó como adecuada si tenía una concentración de al menos 40 ng/μl y una relación DO260/DO280 mínima de 1.6, considerando una relación adecuada de 1.8-2.0. Con base en las lecturas se realizó una dilución de 100 ng/μl en las muestras que tenían una concentración de ADN mayor a 100 ng/μl (146), las muestras con una concentración menor se utilizaron directamente (67).

6.10.1.4.- Identificación del polimorfismo -173 G/C en el gen *MIF*

Para identificar el SNP -173 G/C de *MIF* se amplificó un fragmento de 366 pb que contiene el sitio polimórfico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final, utilizando los siguientes iniciadores (Llamas-Covarrubias et al., 2013).

Sentido: 5'-ACTAAGAAAGACCCGAGG-3'

Antisentido: 5'-GGGGCACGTTGGTGTTTACG-3'

La complementariedad de los iniciadores se verificó en la base de datos del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*) mediante el programa BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) (Figura 5).

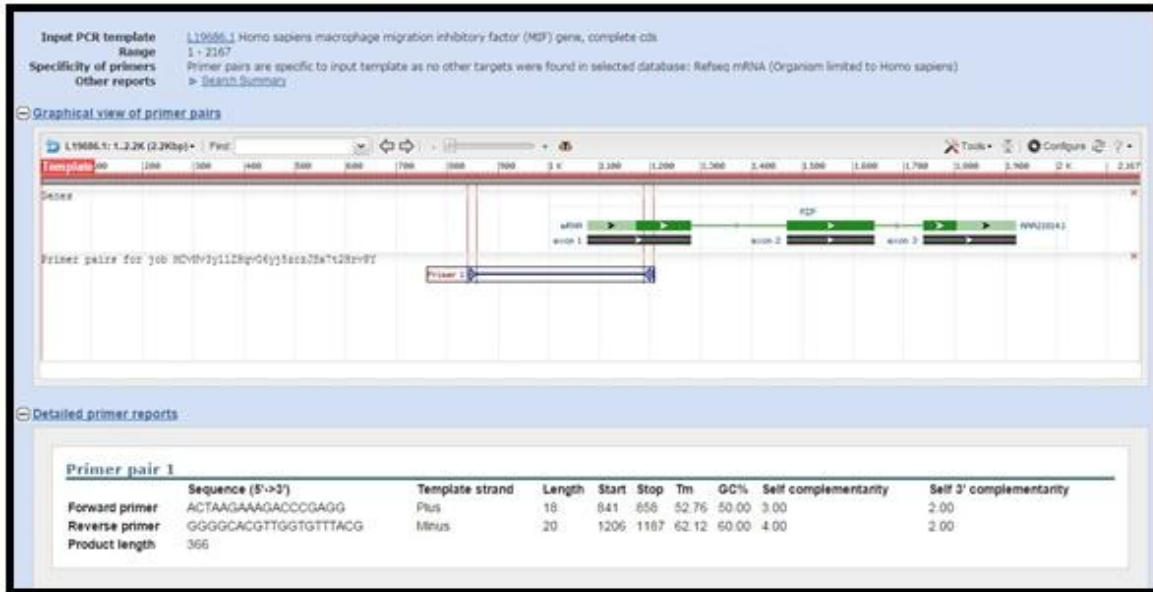


Figura 5.- Representación bioinformática de la unión de los iniciadores a la región de estudio del gen *MIF*. Las flechas azules representan ambos iniciadores y donde se unen, las líneas rojas representan su longitud, en verde el ARNm del gen, en gris los exones, los espacios entre exón corresponden a los intrones, el espacio blanco antes de los exones corresponde a la región promotora del gen *MIF*. En el recuadro de la parte inferior se detallan los datos de cada iniciador.

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 15 μ L, con los siguientes reactivos y condiciones (Cuadro 5 y 6).

Cuadro 5.- Reactivos y concentración final utilizada en la PCR

Reactivos	Concentración final
Buffer	1X
MgCl ₂	5 mM
dNTPs	0.1 mM
Iniciador sentido	0.09 μ M
Iniciador antisentido	0.09 μ M
<i>Taq</i> Polimerasa de ADN	0.12 ^U / μ L
Betaina	1.2 mM
ADNg	100 ng/ μ L
Agua inyectable	Hasta completar 15 μ L

Cuadro 6.- Programa para la PCR para la amplificación del SNP -173 G/C de MIF.

Fase	Tiempo
<i>Desnaturalización inicial</i>	95°C – 4 minutos
	30 ciclos
<i>Desnaturalización</i>	95°C – 30 segundos
<i>Alineamiento</i>	60°C – 30 segundos
<i>Extensión</i>	72°C – 30 segundos
<i>Extensión final</i>	72°C – 2 minutos
<i>Mantenimiento</i>	4°C – hasta su uso

Para identificar si los productos de PCR amplificaron correctamente se tomaron 7 μL del producto de reacción, y se hizo una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% con 0.5X de tris-borato-EDTA (TBE) y se corrieron a 125 Volts por 90 minutos utilizando buffer TBE con la misma concentración que el gel. Se utilizó un marcador de 100 pb (Invitrogen) para identificar el fragmento esperado. Los geles fueron teñidos con AgNO_3 al 0.2% para observar la banda de interés (Anexos 3 y 4)

La identificación del polimorfismo se llevó a cabo utilizando la técnica de RFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) para identificar si el sitio de corte de la endonucleasa *Alu I* (obtenida de *Arthrobacter luteus*) se encontraba presente en el fragmento amplificado. No olvidar que el fragmento de estudio posee otra secuencia de reconocimiento adicional a la región polimórfica para que la enzima de restricción corte. *Alu I* (New England Biolabs) reconoce el siguiente patrón en el ADN:

5'...AG ∇ CT...3'

3'...TC ∇ GA...5'

Los fragmentos obtenidos de la PCR fueron digeridos en un volumen final de 10 μL utilizando las condiciones del cuadro 7 (todo el proceso fue en frío), los patrones de restricción esperados se representan en el cuadro 8.

Cuadro 7. Mezcla de digestión con *Alu I*

Reactivo	Concentración	Volumen añadido
<i>Alu I</i>	10 $\text{U}/\mu\text{L}$	0.3 μL
Buffer Cut Smart	10 X	1.2 μL
Agua Inyectable	—	7.5 μL
Producto de PCR	—	1 μL

La mezcla de reacción se dejó a 37° C durante 16 horas, posteriormente se desactivó la enzima a 80°C durante 20 minutos. Los productos fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

Cuadro 8.- Patrones de restricción generados por la enzima *Alu I*

Genotipo	Número de bandas	Tamaño en pb*
G/G	2	268 y 98
G/C	4	268, 206, 98 y 62
C/C	3	206, 98 y 62

*pb: pares de bases

7 µL del producto de digestión fueron cargados en geles de poliacrilamida al 6% con 0.25X de TBE y se corrieron a 125 Volts por 90 minutos utilizando buffer TBE con la misma concentración que el gel. Se utilizó un marcador de 100 pb para identificar las bandas esperadas. Los geles fueron teñidos con AgNO₃ al 0.2% para visualizar las bandas de interés (Anexos 3 y 4)

6.10.3.- Análisis estadístico

La determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos se llevó a cabo por conteo directo.

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -173G/C en pacientes y controles fueron analizadas por χ^2 mediante tablas de contingencia de 2x2. El análisis de la asociación entre genotipos y lepra fue estimado utilizando factor de riesgo (OR) con un intervalo de confianza de 95% (95CI) y los datos fueron analizados con el programa Epi-Info 7.1.2, considerando un nivel de significancia de $p>0.05$.

6.10.4.- Diagrama de trabajo



7.- RESULTADOS

7.1.- Características de los pacientes

En el estudio se incluyeron 213 individuos originarios del occidente de México: 102 sujetos clínicamente sanos como grupo control y 111 sujetos con diagnóstico clínico, histopatológico y bacteriológico de lepra lepromatosa de acuerdo a los criterios propuestos por Ridley y Jopling (1966). El diagnóstico de LL se confirma mediante baciloscopía que se realiza en los lóbulos de la oreja y la cola de la ceja, de donde se obtiene linfa cutánea, con el material extraído se realiza un frotis (Figura 6). Las características clínicas y demográficas de los pacientes con LL se muestran en el cuadro 9. La edad promedio de los pacientes fue de 55 años, el 55.8% fueron hombres y 44.14% mujeres, un 100% de los pacientes estaban bajo tratamiento con poliquimioterapia y presentaron un índice baciloscópico de 2 o más cruces.

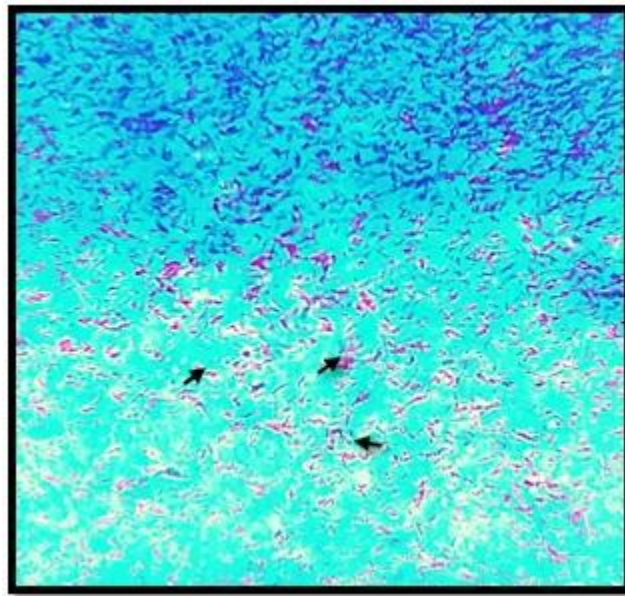


Figura 6.- Baciloscopía positiva. Frotis tomado de la cola de la ceja de un paciente con lepra lepromatosa, teñido por técnica de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido alcohol resistentes. Se observa una gran cantidad de bacilos teñidos de color rojo (flechas), observado con objetivo 40 X.

Cuadro 9.- Características clínicas y demográficas de pacientes con LL

Característica	LL n=111 (%)
Duración de la enfermedad en años media \pm DS	10.79 \pm 14.58
Género femenino	49 (44.14)
Género Masculino	62 (55.86)
Familiares con lepra	53 (47.74)
Baciloscopía (++ o más)	102 (100)
Tratamiento (PQT)	102 (100)

LL: lepra lepromatosa, DS: desviación estándar, PQT: poliquimioterapia

7.2.- Amplificación del fragmento polimórfico -173 G/C de *MIF*

Los resultados de la búsqueda de la secuencia del gen *MIF* en la base de datos del Centro Nacional de Información en Bioinformática (NCBI por sus siglas en inglés) y del alineamiento de los iniciadores (con BLAST) se presentan en la figura 7. Así mismo se indican los sitios de corte para la enzima *Alu I*.

Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene, complete cds

GenBank: L19686.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS HUMMIF 2167 bp DNA linear PRI 29-SEP-1994
 DEFINITION Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene, complete cds.
 ACCESSION L19686
 VERSION L19686.1 GI:307284
 KEYWORDS macrophage migration inhibitory factor.
 SOURCE Homo sapiens (human)



```

1 ctgcaggaac caatacccat aggctatttg tataaatggg ccatggggcc tcccagctgg
61 aggcctggctg gtgccacgag ggtcccacag gcatgggtgt cttctctata tcacatggcc
121 ttcactgaga ctggtatatg gattgcaacct atcagagacc aaggacagga cctcccctgga
181 aatctctgag gacctggcct gtgatccagt tgctgccttg tctcttctct gctatgtcat
241 ggcttatctt ctttcaccca ttcatctatt cattcattca ttcagcagta ttagtcaatg
301 tctcttgata tgcctggcac ctgctatgat gtccccgagt ttaccattag tggaaaagac
361 atttaagaaa ttacacaaagg gctctatgag aggccatata cggtaggacct gactagggtg
421 tggcttccct gaggagctga agttgcccag agggccagag aagggggagct gagcacgttt
481 gaaccactga acctgctctg gacctcgcct ccttcctctg gtgcctccca gcatcctatc
541 ctctttaaag agcagggggt caggggaagt ccctggatgg tgattcgcag gggcagctcc
601 cctctcacct gccgcacgac tccccgccc catctcaaac acacaagctc acgcatgagg
661 gactggagcc cttgaggaca tggggcccaa agacaggagg tacaggggct cagtgcgtgc
721 agtggaaatg actgggcttc atctctggaa gggttaagggg ccatcttcg ggttcaccgc
781 cgcatcccca cccccggcac agcgcctcct ggcgactaac atcggtagct tagtgaaagg
841 actaagaaag acccgagg-g aggcgggaac aggcgcgatt ctaccgcca agtggagaac
901 agcttggagc ggtgcgcagg gcttagcggc ggttgctgga ggaacgggag ggtcgcacca
961 gggctctgcc ctgcgggggt cgagccgagg caggcgggta cttcccact cggggcggag
1021 ccgcagcctc gccggggcgg ggcctggcgc cggcgggggc gtcacaaaag gccgggaccac
1081 agtgggtgctc gagaagttag gcacgtggct cagcggcggc cgccggcggc gctctgtgctc
1141 ctctgcgcgg gctcctctgg ccttctgcca tcatgccgat gttcacgta aacaccaacg
1201 tgccccgcgc ctccgtgccc gacgggttcc tctccagct caccagcag ctggccagg
1261 ccaccggcaa gccccccag gtttgccggg agggggacagg aagggggggg tgccccccgg
1321 acgagggggtt ccgcgctggg agctgggggg gcgactcctg aacggagctg gggggcggg
1381 cggggggagg acggtggctc gggcccgaag tggacgttcg gggcccgaag aggtcgtg
1441 ggcgggctga ccgcgccctt tctctgcagt acatcggcgt gcacgtggtc ccggaccagc
1501 tcatggcctt cggcggctcc agcggagcct gcgcgctctg cagcctgac acatcggca
1561 agatcggcgg cgccgagaac cgtcctaca gcaagctgct gtgcggcctg ctggccgagc
1621 gcctgcgcat cagccgggac aggtacgcgg agtcgcggag gggcggggga gggcggcg
1681 cgccgggcca ggcgggggac tgagccaacc gctgagtcgg gctcctccc ccgcagggt
1741 ctacatcaac tattacgaca tgaacgcggc caatgtgggc tggaaacaact ccaccttgc
1801 ctaagagccg cagggaacca cgtgtctgct gctggctcca cccgggaacc cgcgcacgc
1861 tgtgttctag ccccggccac ccaaaccttc tggtaggggg aaataaacgg tttagagact
1921 aggaagtgcct cggggttcct tggcttgccc gaggaaattgg tgcagagccg ggacattggg
1981 gagcagagtc gggaaacggg gttgggggag ggggtcaggg ccgggttgc ctctcgaac
2041 ctgctgtgct ggaagccctt tgtccagcct gtcctccta cgtcctaac agaggagcc
2101 cagtgtcttt ccattctatg gcgtacgaag ggatgaggag aagttggcac tctgccctgg
2161 gctgcag
    
```

Homo sapiens MIF antisense RNA 1 (MIF-AS1), long non-coding RNA

Sequence ID: [reflNR_038911.1](#) Length: 2192 Number of Matches: 1

Range 1: 1742 to 1759 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
36.2 bits(18)	0.17	18/18(100%)	0/18(0%)	Plus/Minus
Query 1	ACTAAGAAAGACCCGAGG	18		
Sbjct 1759	ACTAAGAAAGACCCGAGG	1742		

Homo sapiens MIF antisense RNA 1 (MIF-AS1), long non-coding RNA

Sequence ID: [reflNR_038911.1](#) Length: 2192 Number of Matches: 1

Range 1: 1394 to 1413 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.017	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGGGCACGTTGGTGTTTACG	20		
Sbjct 1394	GGGGCACGTTGGTGTTTACG	1413		

Figura 7.- Fragmento amplificado del SNP -173 G/C de *MIF*. En recuadros azules se muestran los sitios de unión de ambos iniciadores, presentando un 100% de complementariedad, el recuadro rojo

indica el sitio polimórfico donde ocurre el cambio de G/C dando origen al sitio de corte para la enzima de restricción *Alu I*, en verde se resalta otro sitio de reconocimiento de la enzima.

7.3 Optimización de la PCR

Para incrementar el rendimiento y la especificidad de los productos de PCR se utilizó betaína, un agente isoestabilizador que iguala la contribución de las uniones G-C y A-T, proporcionando estabilidad al ADN (Frackman et al., 1998). Los resultados obtenidos después de la amplificación de los productos polimórficos por PCR se observan en la figura 8, donde se puede ver con claridad que no hay presencia de bandas inespecíficas.

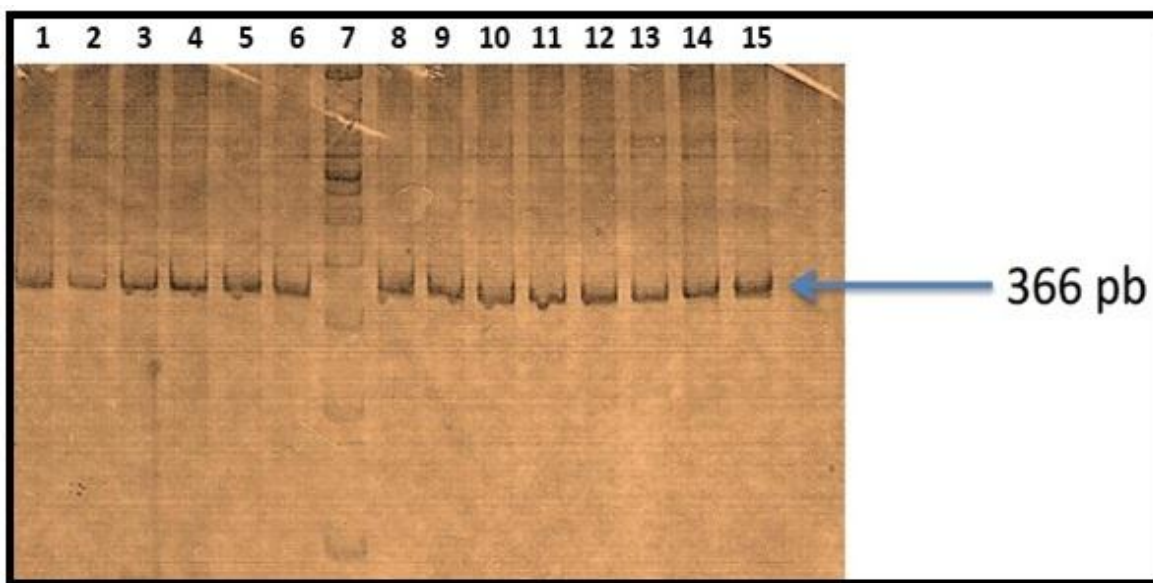


Figura 8.- Productos de PCR visualizados en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con AgNO_3 al 0.2%. El tamaño del fragmento amplificado es de 366 pb; carril 7 marcador molecular de 100 pb. pb: pares de bases.

7.4 Genotipificación del polimorfismo -173 G/C de *MIF*

Después de lograr amplificar el fragmento polimórfico, se realizó la genotipificación del polimorfismo mediante RFLPs. El proceso fue llevado a cabo utilizando la enzima *Alu I* (New England Biolabs), que reconoce el cambio de nucleótido único G/C en la región del promotor -173 de *MIF*. El patrón de bandas que se observa después de la digestión se visualiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 6%, teñidos con nitrato plata 0.2%, en la figura 9 se muestra un esquema del patrón de bandas que se obtienen de la digestión.

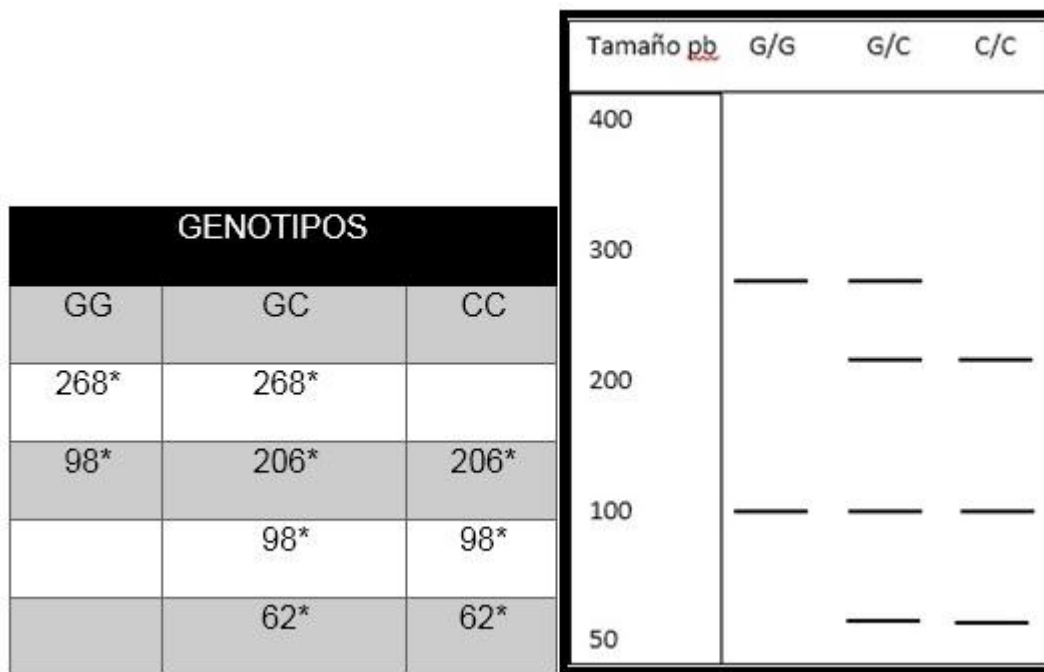


Figura 9.- Patrón de bandeo generado por digestión con la enzima *Alu I*. *Tamaño de fragmentos representados en pares de bases

En la figura 10 se muestra un gel representativo donde se visualizan los fragmentos obtenidos de la digestión con *Alu I*.

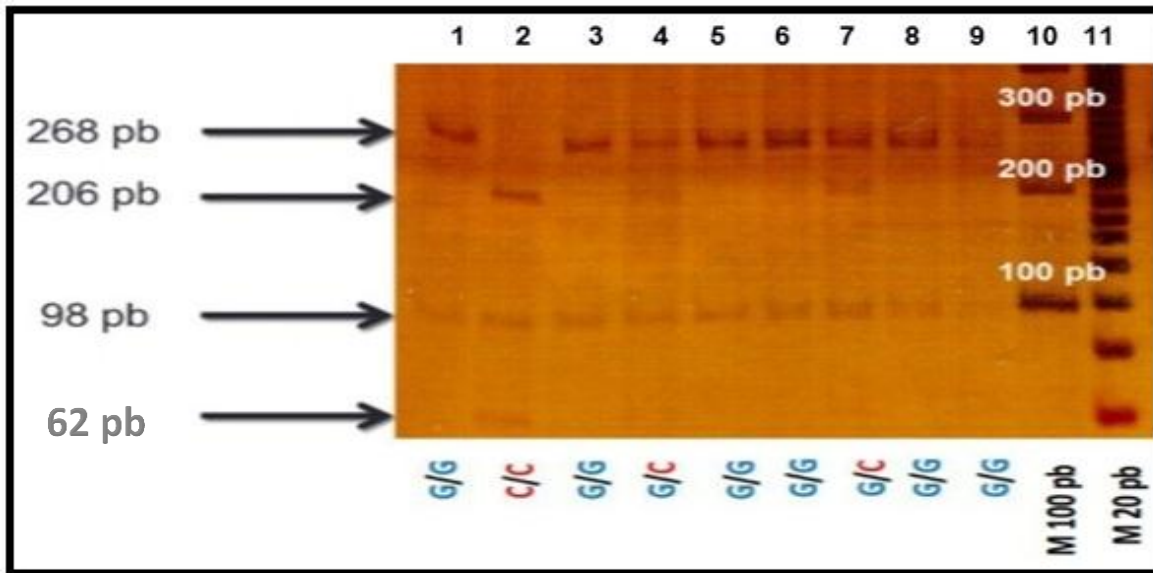


Figura 10.- Digestión con *Alu I*. Carriles 1-9 productos de digestión visualizados en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con AgNO_3 al 0.2%. M 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb y M 20 pb: marcador de peso molecular de 20 pb.

En el cuadro 10 se muestra la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -173 G/C de *MIF*. En este estudio el polimorfismo evaluado se encontró en equilibrio génico de Hardy-Weinberg. Al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes y sujetos sanos no encontramos diferencia estadística significativa con un valor de $p=0.407$ para frecuencias genotípicas y una $p=0.358$ para frecuencias alélicas, lo cual indica que no existe asociación entre el polimorfismo -173 G/C del gen *MIF* y el desarrollo de lepra lepromatosa en pacientes mestizos del occidente de México.

Cuadro 10.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -173 G/C *MIF* en pacientes y grupo control.

SNP	Genotipo Alelos	Grupo control n=102(%)	Pacientes LL n= 111(%)	OR IC (95%)	Valor de <i>p</i>
<i>-173 G/C MIF</i>	G/G	60 (59)	56 (50)		
	G/C	35 (34)	48 (44)	1.469 (0.832-2.592)	0.183
	C/C	7 (7)	7 (6)	1.071 (0.353-3.248)	0.902
	G	155 (76)	160 (72%)		
	C	49 (24)	62 (28%)	1.225(0.793-1.893)	0.358

*Equilibrio de Hardy-Weinberg $p= 0.832$

8.- DISCUSIÓN

Como se mencionó, los pacientes con lepra lepromatosa (LL) presentan un tipo de respuesta inmune que es incapaz de controlar la infección por *M. leprae*. Debido a que existe un limitado acervo genético entre las cepas de este patógeno, la variabilidad genética del hospedero podría ser determinante para identificar qué factores predisponen a un individuo a que desarrolle el polo lepromatoso de la enfermedad.

Las infecciones por parásitos son importantes causas de morbilidad y mortalidad en humanos, factores asociados al parásito y componentes derivados del hospedero son importantes moduladores de la inflamación. En este contexto MIF es sobre-expresada en la mayoría de las infecciones, sin embargo el papel de MIF en la respuesta inmune contra parásitos aun no es claro.

En estudios previos se ha reportado la importancia de MIF en el control de enfermedades infecciosas causadas por parásitos intracelulares como *Plasmodium falciparum* responsable de la malaria, donde una alta expresión de MIF puede ser peligrosa debido a que las complicaciones inflamatorias en esta infección suelen ser letales. Por otra parte MIF parece ser central para controlar otras enfermedades infecciosas como leishmaniasis, tripanosomiasis, toxoplasmosis, neosporosis, coccidiosis y meningoencefalitis (de Dios & Rodrigues-Sosa, 2011)

En el presente trabajo se evaluó la asociación del polimorfismo -173 G/C de *MIF* con el desarrollo de LL en pacientes mestizos del occidente de México.

Este es el primer estudio en el cual se ha buscado la asociación entre el polimorfismo -173 G/C de *MIF* y el desarrollo de LL en población del occidente de México. En nuestro grupo de sujetos clínicamente sanos y pacientes con LL, el polimorfismo se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual indica que después de varias generaciones de entrecruzamiento al azar los diferentes genotipos del polimorfismo se han segregado de manera aleatoria de una generación a otra en nuestra población (Zhou et al., 2009).

Observamos que las frecuencias genotípicas G/G (59%), G/C (34%) y C/C (7%), en el grupo control se distribuyeron de forma similar a las reportadas en estudios previos, realizados en población mestiza del occidente de México donde se analizó el SNP -173 G/C de *MIF* y su asociación con artritis reumatoide, donde se reportaron las siguientes frecuencias en el grupo control G/G (53%), G/C (42%) y C/C (5%) (Llamas-Covarrubias et al., 2013), además el equipo de De la Cruz-Mosso et al. (2014), encontraron una distribución genotípica de G/G (53%), G/C (43%) y C/C (4%), en el grupo control de un estudio donde se evaluó la asociación del SNP -173 G/C de *MIF* con los niveles solubles de MIF y TNF- α en lupus eritematoso generalizado.

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -173 G/C de *MIF* de nuestro estudio entre pacientes mestizos con LL del occidente de México y el grupo control no mostraron diferencias estadísticas significativas, en estudios realizados en distintas poblaciones de otras partes del mundo Li et al. (2012) identificaron una asociación entre el polimorfismo -173 G/C de *MIF* y el desarrollo de tuberculosis en población del sudeste de China. Por otra parte el equipo de trabajo de Hashemi et al. (2015) encontraron que el cambio de nucleótido de G/C puede elevar el riesgo a desarrollar paratuberculosis (PTB) en población del sudeste de Irán. Sadki et al. (2010) descubrieron un incremento en las frecuencias del homocigoto CC y el alelo C en pacientes con PTB comparados con un grupo control en población marroquí, de igual manera el estudio de Gómez et al. (2007) reportó que el alelo C incrementa el riesgo a desarrollar tuberculosis en población colombiana. El SNP -173 G/C de *MIF* ha sido asociado con un incremento en la susceptibilidad o severidad de procesos inflamatorios en enfermedades como tuberculosis, paratuberculosis, leishmaniasis y malaria (Hashemi et al., 2015), sin embargo este proceso parece ser diferente en lepra. En conjunto estos datos podrían indicar que el papel de MIF en LL es distinto al observado en estas patologías, reforzando la teoría de que la influencia de MIF en la severidad de las enfermedades infecciosas depende en particular del patógeno (Das et al., 2013). Estudios posteriores en diferentes poblaciones con influencia racial distinta son necesarios para validar los resultados.

Las frecuencias alélicas de nuestro grupo control G (76%) y C (24%) y las obtenidas en pacientes con LL G (72%) y C (28%) concuerdan con las reportadas en estudios previos en población mestiza del occidente mexicano donde los grupos de Llamas-Covarrubias et al. (2013) y De la Cruz-Mosso et al. (2014) obtuvieron G (74%), C (26%), y con los resultados del equipo de Gómez et al. (2007) en su estudio al evaluar si el SNP -173 G/C de *MIF* influye en el riesgo a desarrollar tuberculosis en población del noroeste colombiano G (74.9%), C (25.1%), así como con las datos generados por Sadki et al. (2010) al norte de África (72.97%) y (27.03%) respectivamente. Sin embargo, la distribución de las frecuencias es diferente en comparación con las reportadas por Li et al. (2012) en el sudeste de China G (82.82%) y C (17.18%) y por Hashemi et al. (2015) en el sudeste de Irán G (86.02%) y C (13.98%). De acuerdo a nuestros resultados encontramos similitudes con la población del norte de África, y observamos que existe una mayor presencia de la variación G/C en el occidente de México que en poblaciones asiáticas.

Las diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas se pueden atribuir a la influencia racial la cual es determinante en la distribución heterogénea de los polimorfismos genéticos. La población del occidente de México es de ascendencia principalmente Europea (60-64%) seguida por la Amerindia (25-21%) y Africana (15%), en conjunto esto da origen a la población mestizo mexicana del occidente mexicano, la cual presenta un componente de ancestría europea más elevado que otras regiones del país como centro y sudeste, dando como resultado una alta diversidad genética en la distribución de este y otros polimorfismo genéticos (Rangel-Villalobos et al., 2008).

Nuestros resultados indican que la presencia del polimorfismo -173 G/C de *MIF* en población mestiza del occidente de México no es un factor determinante para que el paciente desarrolle LL, por lo que otros factores genéticos involucrados en la naturaleza de la respuesta inmune deben ser estudiados en esta patología.

9.- CONCLUSIONES

- El polimorfismo -173 G/C de *MIF* se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en población mestiza del Occidente de México
- Existe una mayor presencia de la variación G/C en el occidente de México que en poblaciones asiáticas.
- No existe asociación entre el polimorfismo -173 G/C y el desarrollo de lepra lepromatosa en población del occidente de México.
- La lepra lepromatosa podría seguir vías fisiopatológicas distintas a las observadas en otras enfermedades infecciosas causadas por parásitos intracelulares, donde se ha reportado que *MIF* tiene un papel central en la evolución de la enfermedad.

10.- PERSPECTIVAS

Evaluar si existe una asociación entre los posibles genotipos del polimorfismo -173 G/C de *MIF* y los niveles séricos de MIF en pacientes con lepra lepromatosa. Además de estudiar el otro polimorfismo funcional en la región promotora de *MIF* consistente de repeticiones cortas en *tándem* (STR por sus siglas en inglés) -794CATT₅₋₈ y su asociación con el desarrollo de LL.

11.- ANEXOS

Anexo 1. Forma de consentimiento informado para pacientes y controles

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: "DETERMINACIÓN DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* PARA MEJOR DIAGNÓSTICO"

Nombre: _____

Edad: _____ (años) Género: _____ M _____ F _____

Lugar: Guadalajara, Jalisco _____ Fecha: _____
(día / mes/ año)

Clave sujeto de estudio: _____

Se solicita lea el siguiente material para que pueda entender los riesgos de su participación en este proyecto y decida participar o no, de manera libre e informada.

Objetivo de este proyecto: determinar las cepas de *Mycobacterium leprae* en la población de occidente de México para mejorar el diagnóstico de los pacientes.

La participación de cada persona en este estudio consistirá en un examen físico realizado por el médico dermatólogo, y la aceptación a que se realice una toma de muestra de 10 mL de sangre extraída del brazo, muestra por raspado de la oreja y en caso necesario una biopsia de 5mm, realizada por el personal del laboratorio así como contestar un cuestionario al personal del laboratorio y fotografías de las lesiones en caso de ser necesario.

Riesgos e inconvenientes: La toma de las muestras de sangre del brazo y del raspado de la oreja, es considerado por la Ley General de Salud, en materia de Investigación para la Salud, como de RIESGO MÍNIMO, en el que se pudieran presentar en el sitio cierto tipo de molestias locales, ligero enrojecimiento de la zona y en el menor de los casos una pequeña mancha tipo moretón. De presentarse estos, contará con la atención necesaria donde se tomen las muestras.

Beneficios: La participación en este estudio no beneficiará directamente al sujeto. Los beneficios se verán reflejados en mejorar el abordaje de la enfermedad.

Declaro que he sido informado(a) que:

- Mi participación es voluntaria.
- Atenderán cualquier pregunta o aclaración acerca del proyecto y otros asuntos relacionados con la investigación, además de proporcionarme si así lo decido, sobre los resultados.
- Que mi participación en el proyecto no obliga al proyecto ni a los responsables, a otorgarme atención a los problemas de salud diagnosticados a partir de la toma de muestra.
- Los resultados, son únicamente con fines de investigación y que serán difundidos entre la comunidad científica. Atendiendo siempre que los datos personales serán confidenciales y únicamente tendrán acceso a ellos los investigadores principales de este estudio.
- Mi participación no me generará gasto alguno, ni existe remuneración alguna por participar.

Confidencialidad: La confidencialidad de la información personal será protegida conforme lo indica la ley. Las muestras de identificarán con un código y no por el nombre. Los resultados, no estarán disponibles para terceras personas, a menos que por ley o autoridades sean solicitados, con el objetivo de verificar la información obtenida de este estudio.

Consentimiento y liberación: Reconozco que he leído y entendido este documento, he preguntado y recibido respuesta satisfactoria a mis preguntas antes de otorgar el presente consentimiento, me informaron y contestaron amplia y detalladamente de inconveniencias, peligros y efectos, así como de los métodos y medios de toma de muestra, a realizarse en este estudio, quedando ampliamente satisfecho con la información recibida. Esta información se me ha proporcionado por escrito y en español. Mi participación es voluntaria y si quisiera desistir en mi participación, éste desistimiento será aceptado sin preguntas y no representará ningún problema para mi atención en las diferentes instituciones de salud.

Mi firma indica que **otorgo mi consentimiento informado** para participar en este estudio, después de leído, entendido y recibido explicación de la información.

Autorizo la liberación de mis registros médicos para el investigador, comité de ética y autoridades reguladoras.

Nombre de la persona otorgante del consentimiento	Firma
Nombre del testigo:	Firma
Nombre del testigo:	Firma

Al firmar esta forma, no he renunciado a ninguno de mis derechos legales que de otro modo tendría como un participante en un estudio de investigación. Por lo tanto no tengo ningún inconveniente en contestar el cuestionario adicional que me presenten para el registro de mi participación. También he recibido una copia de esta forma de consentimiento.

Nombre del Investigador Responsable	Firma	Fecha
-------------------------------------	-------	-------

En caso de alguna duda sobre el estudio comunicarse con la Dra. Mary Fafutis Morris, Investigador responsable, 9:00 am a 2:00 pm, en el Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología.

Anexo 2. Encuesta realizada a los pacientes con lepra lepromatosa

Fecha: _____

Nombre: _____

Dirección: _____

Ciudad: _____ Teléfono: _____

Sexo: _____ Fecha de Nacimiento: _____ Edad: _____

Diagnóstico en el Paciente: _____

Tiempo de Evolución de la Enfermedad: _____

Tratamiento que recibe (dosis y desde hace cuanto tiempo): _____

1) Señale si ha tenido dolor y/o inflamación en alguna de las siguientes articulaciones:

	<u>Lado Derecho</u>		<u>Lado izquierdo</u>	
	<u>Dolor</u>	<u>Inflamación</u>	<u>Dolor</u>	<u>Inflamación</u>
Temporo-Maxilar	_____	_____	_____	_____
Hombro	_____	_____	_____	_____
Codo	_____	_____	_____	_____
Muñeca	_____	_____	_____	_____
Metacarpofalángicas	_____	_____	_____	_____
Interfalángico Proximales	_____	_____	_____	_____
Cadera	_____	_____	_____	_____
Rodilla	_____	_____	_____	_____
Tobillo	_____	_____	_____	_____
Metatarsfalángicas	_____	_____	_____	_____
Interfalángico Proximales	_____	_____	_____	_____

2) Al levantarse por las mañanas se siente entumido de sus articulaciones: SÍ _____ NO _____. Si la respuesta fue SI, cuanto tiempo le dura la molestia en minutos: _____.

- 3) Ha notado que los dedos de sus manos o pies se le ponen pálidos o fríos: SÍ _____, NO _____.
- 4) Se le ha caído recientemente el cabello en gran cantidad: SÍ _____, NO _____.
- 5) Le han aparecido manchas rojas en la piel: SÍ _____, NO _____. Si la respuesta fue SI, anote el sitio donde le han salido las manchas _____.
- 6) Le han aparecido úlceras dentro de su boca (aftas): SÍ _____, NO _____.
- 7) Ha notado que se le inflamen sus manos en forma difusa y que sus dedos de las manos tomen la forma de "salchicha". SÍ _____, NO _____.
- 8) Ha notado que la piel de sus manos o de los dedos se ponga "dura", o que tomen un aspecto "acartonado". SÍ _____, NO _____.
- 9) Ha tenido fiebre mayor de 38° C. recientemente. SÍ _____, NO _____.
- 10) Anote alguna otra molestia importante que haya tenido o notado en el último mes:

Antecedentes Familiares:

Conoce a personas con Lepra:

a) Quienes?

b) Las frecuenta?

En su Localidad existen armadillos?

a) Los consume?

Alguna vez ha estado en USA?

En donde?

Cuanto tiempo?

Ha salido fuera del país que no haya sido USA?

Anexo 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

El análisis de producto de PCR así como de los productos de digestión con enzimas de restricción se llevó a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida. Estos geles se forman por la polimerización del grupo vinilo de monómeros de acrilamida, y consiste en largas cadenas de poliacrilamida cruzadas al azar de un co-monómero bifuncional, usualmente N,N-metilén-bis-acrilamida. La reacción produce cadenas al azar de poliacrilamida que incorporan una pequeña porción de moléculas de bis-acrilamida formando una malla tridimensional a través de la cual se desplaza el ADN. La concentración de acrilamida determina el promedio de longitud de la cadena polimerizada y la concentración de bis-acrilamida determina la cantidad de puentes formados. La polimerización de los monómeros procede por un mecanismo de formación de radicales libres que es iniciado por un catalizador, de éstos el más empleado es el persulfato de amonio (PSA), el cual produce los radicales de oxígeno libre mediante un proceso que es catalizado por una base, como por ejemplo, las aminas alifáticas terciarias N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED); cuya función es acelerar esta reacción de polimerización (Sanguinetti *et al.*, 1994). Debido a la naturaleza neurotóxica de la acrilamida y la bis-acrilamida se recomienda evitar contacto directo con ellas; razón por la cual se sugiere el uso de guantes y cubre bocas.

Todos los geles de poliacrilamida fueron no desnaturizantes, es decir, sin aditivos como urea, glicerol o sacarosa.

Procedimiento

1. Mezclar acrilamida y bis-acrilamida en proporción 1:30 y aforar con agua bidestilada
2. Agitar la mezcla hasta que la solución quede cristalina
3. Preparar la poliacrilamida a una concentración de 6% con 0.5X TBE para los productos de PCR y 0.25X TBE para los productos de digestión.
4. Colocar los vidrios con sus separadores en la cámara para gelificar geles
5. En un recipiente colocar 40 mL de poliacrilamida, μ L de PSA y μ L de TEMED

6. Agregar la solución de poliacrilamida a los vidrios y por último colocar el peine y dejar que el gel polimerice por 30 minutos, posteriormente se almacena a 4°C por al menos 24 horas para su uso
7. Transcurridas las 24 horas se desprende el peine y se retira el exceso de poliacrilamida con agua destilada
8. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar buffer TBE con la misma concentración del gel, procurando cubrir los filamentos de platino de la cámara
9. Se prepara una mezcla de 7 μL del producto amplificado y 2 μL de buffer de carga y se deposita en cada uno de los pozos del gel, en el carril central se agrega 1.5 μL de marcador de peso molecular de 100 pb
10. El gel se corre a 125 volts por 90 minutos.

Anexo 4. Tinción de geles de poliacrilamida con AgNO_3

Procedimiento

1. Desmontar el gel de la cámara de electroforesis
2. Colocarlo en un recipiente amplio para el proceso de tinción
3. Cubrir el gel con solución fijadora y ponerlo en el agitador a 90 rpm durante 5 minutos, desechar la solución
4. Cubrir el gel con AgNO_3 al 0.2 % durante 5 minutos, desechar la solución en un recipiente para su posterior desactivación con NaCl
5. Realizar dos lavados con agua destilada en el agitador a 90 rpm, el primero de 3 minutos y el segundo de 1 minuto, desechar el agua.
6. Adicionar un poco de solución reveladora, enjuagar rápidamente el gel y desechar inmediatamente, esto con la finalidad de eliminar los remanentes de plata y evitar que el gel se tiña muy oscuro.
7. Cubrir el gel en solución reveladora hasta que aparezcan las bandas, y desecharla
8. Sumergir el gel en solución fijadora 1 minuto, y desecharla
9. Lavar el gel con agua destilada y pasar a una bolsa de plástico para su almacenamiento a 4°C

REFERENCIAS

Alcaïs, A., Abel, L., & Casanova, J. (2009). Review series Human genetics of infectious diseases : between proof of principle and paradigm. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2506–2514.

Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., & Bucala, R. (1993). MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365, 756–759.

Bloom, B. R., & Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 153(3731), 80–82.

Bloom, J., & Al-Abed, Y. (2014). MIF: mood improving/inhibiting factor? *Journal of neuroinflammation*, 11(1), 1-9.

Bonivento, P., Blanco, O., & Cantillo, A. (2010). Lepra y estados reaccionales. A propósito de un caso y revisión bibliográfica. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*, 7(1), 71-78.

Bucala, R. (2012). *The MIF Handbook*. World Scientific.

Bucala, R. (2013). MIF, MIF alleles, and prospects for therapeutic intervention in autoimmunity. *Journal of clinical immunology*, 33(1), 72-78.

Calandra, T., & Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews immunology*, 3(10), 791-800.

Casanova, J., & Abel, L. (2005). Inborn errors of immunity to infection the rule rather than the exception. *The Journal of experimental medicine*, 202(2), 197-201.

Chapman, S., & Hill, A. (2012). Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(3), 175-188.

Chatterjee, M., Borst, O., Walker, B., Fotinos, A., Vogel, S., Seizer, P., & Gawaz, M. (2014). Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling. *Circulation research*, 115(11), 939-949.

Cole, S., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., & Barrell, B. G. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409(6823), 1007-1011.

Das, R., Koo, M., Kim, B., Jacob, S., Subbian, S., Yao, J., ...& Bucala, R. (2013). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), 2997-3006.

David, J. R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(1), 72-77.

de Dios, J., & Rodriguez-Sosa, M. (2011). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1239-1256.

De la Cruz-Mosso, U., Bucala, R., Palafox-Sánchez, C., Parra-Rojas, I., Padilla-Gutiérrez, J., Pereira-Suárez, A., & Muñoz-Valle, J. F. (2014). Macrophage migration inhibitory factor: Association of -794 CATT 5-8 and -173 G> C polymorphisms with TNF- α in systemic lupus erythematosus. *Human immunology*, 75(5), 433-439.

Dirección General de Epidemiología. (2014). Boletín Epidemiológico 202.

Donn, R., Shelley, E., Ollier, W., & Thomson, W. (2001). A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 44(8), 1782-1785.

Fava, V., Orlova, M., Cobat, A., Alcaïs, A., Mira, M., & Schurr, E. (2012). Genetics of leprosy reactions: an overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 132-142.

Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C., & Solomon, A. W. (2010). Neglected tropical diseases. *British medical bulletin*, 93(1), 179-200.

Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D., & Storts, D. (1998). Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega notes*, 65(27-29), 27-29.

Gomez, L., Sanchez, E., Ruiz-Narvaez, E., López-Nevot, M., Anaya, J. M., & Martin, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor gene influences the risk of developing tuberculosis in northwestern Colombian population. *Tissue Antigens*, 70(1), 28-33.

Grieb, G., Merk, M., Bernhagen, J., & Bucala, R. (2010). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. *Drug news & perspectives*, 23(4), 257.

Guerrero, E., Martínez, F., Diéguez, C., Arrazola, J., & Guzmán, R. (2012). Lepra. Clasificación y cuadro clínico. *Dermatol Rev Mex*, 56(1), 47-54.

Hashemi, M., Sharifi-Mood, B., Rasouli, A., Amininia, S., Naderi, M., & Taheri, M. (2015). Macrophage migration inhibitory factor-173 G/C polymorphism is associated with an increased risk of pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *EXCLI Journal*, 14, 117-122.

Joyce, M. P. (2012). Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 17-21.

Krivokuća, M., Stefanoska, I., Rabi, T., Al-Abed, Y., Stošić-Grujičić, S., & Vićovac, L. (2015). Pharmacological inhibition of MIF interferes with trophoblast cell migration and invasiveness. *Placenta*, 36(2), 150-159.

Koff, W., Burton, D., Johnson, P., Walker, B., King, C. R., Nabel, G., & Plotkin, S. A. (2013). Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science*, 340(6136), 1232-1239.

Lastória, J., & Abreu, M. (2014). Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects-Part 1. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89(2), 205-218.

Lehmann, L., Novender, U., Schroeder, S., Pietsch, T., von Spiegel, T., Putensen, C., ... & Stüber, F. (2001). Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive care medicine*, 27(8), 1412-1415.

Li, Y., Yuan, T., Lu, W., Chen, M., Cheng, X., & Deng, S. (2012). Association of tuberculosis and polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in a Southwestern China Han population. *Cytokine*, 60(1), 64-67.

Llamas-Covarrubias, M., Valle, Y., Bucala, R., Navarro-Hernández, R., Palafox-Sánchez, C. A., Padilla-Gutiérrez, J. R., & Muñoz-Valle, J. F. (2013). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): genetic evidence for participation in early onset and early stage rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 61(3), 759-765.

Malu, D., Bélanger, B., Desautels, F., Kelendji, K., Dalko, E., Sanchez-Dardon, J., ... & Scorza, T. (2011). MIF: a down-regulator of early T cell-dependent IFN- γ responses in *Plasmodium chabaudi adami* (DK) infected mice. *Journal of Immunology*, 186(11), 6271.

Marvast, M., Sima, H. R., Ghaffarzadehgan, K., Kermani, A. T., & Norouzi, N. (2011). Clinicopathological significance of macrophage migration inhibitory factor and its relation with p53 in gastric cancer. *Journal of gastrointestinal cancer*, 42(1), 5-10.

Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.

Modlin, R. L. (1994). Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *Journal of investigative dermatology*, 102(6), 828-832.

Muñoz, M, Constanza, C., Hernández, B., & Navarrete, J. (2012). La lepra: patología con conciencia histórica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 33(1), 32-43.

Naafs, B. (2006). Treatment of Leprosy: science or politics?. *Tropical Medicine & International Health*, 11(3), 268-278.

Nishihira, J. (2012). Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1271(1), 53-57.

Norma Oficial Mexicana (2002). 087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud Ambiental-Residuos. *Diario oficial de la Federación*.

Pinheiro, R., de Souza Salles, J., Sarno, E., & Sampaio, E. (2011). Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future microbiology*, 6(2), 217-230.

Puri, K., Suresh, K., Gogtay, N., & Thatte, U. (2009). Declaration of Helsinki, 2008: implications for stakeholders in research. *Journal of postgraduate medicine*, 55(2), 131.

Ridley, D., & Jopling, W. (1996). Classification of leprosy according to immunity. *International Journal of Leprosy*, 34(3), 255-273.

Rodrigues, L., & Lockwood, D. (2011). Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet infectious diseases*, 11(6), 464-470.

Saini, C., Ramesh, V., & Nath, I. (2013). CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7), 23-38.

Sanguinetti, C., Dias, N., & Simpson, A. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17(5), 914-921.

Sasaki, S., Takeshita, F., Okuda, K., & Ishii, N. (2001). Mycobacterium leprae and leprosy: a compendium. *Microbiology and Immunology*, 45(11), 729-736.

Sauer, M., Salomão, H., Ramos, G., Espindula, H., Rodrigues, R., Macedo, W., ... & Mira, M. T. (2015). Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. *Clinics in dermatology*, 33(1), 99-107.

Schuenemann, V., Singh, P., Mendum, T., Krause-Kyora, B., Jäger, G., Bos, K., ... & Krause, J. (2013). Genome-wide comparison of medieval and modern Mycobacterium leprae. *Science*, 341(6142), 179-183.

del Solar, M., Salomón, M., & Bravo, F. (2005). Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética: reporte de casos y revisión de la literatura. *Folia Dermatologica*, 16(3), 127-135.

Talhari, C., Talhari, S., & Penna, G. (2015). Clinical aspects of leprosy. *Clinics in Dermatology*, 33(1), 26–37.

Tillmann, S., Bernhagen, J., & Noels, H. (2013). Arrest functions of the MIF ligand/receptor axes in atherogenesis. *Frontiers in immunology*, 4(115), 1-20.

Truman, R., Singh, P., Sharma, R., Busso, P., Rougemont, J., Paniz-Mondolfi, A., Kapopoulou, A., Brisse, S., Scollard, D., Gillis, T., & Cole, S. T. (2011). Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *New England Journal of Medicine*, 364(17), 1626-1633.

World Health Organization. (1982). Chemotherapy of leprosy for control programmes: report of a WHO study group [meeting held in Geneva from 12 to 16 October 1981].

World Health Organization. (1991). WHA44.9 Leprosy, 2(1), 2–5.

World Health Organization. (2012). WHO Expert Committee on Leprosy. *World Health Organization technical report series*, (968), 1.

World Health Organization (2012). Global leprosy situation, *Weekly epidemiological record*, 34(87), 317-328.

Zheng, Y., Yang, M., Rong, T., Yuan, X., Ma, Y., Wang, Z., ... & Cui, L. (2012). CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer. *World journal of gastroenterology*, 18(18), 2253.

Zhou, J., Lange, K., Papp, J., & Sinsheimer, J. (2009). A heterozygote–homozygote test of Hardy–Weinberg equilibrium. *European Journal of Human Genetics*, 17(11), 1495-1500.