



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN  
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

---

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE POLIMORFISMOS (SNPs)  
PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR  
PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS  
Y VIH/SIDA.

## TESIS

PARA OBTENER EL GRADO  
ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA  
ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA MÉDICA Y  
FARMACÉUTICA

PRESENTA  
ING. EN BIOTECNOLOGÍA LUIS ANTONIO CRUZ  
DIAZ

**Tutor académico:** Dr. Ernesto Prado Montes de Oca.  
**Tutor en planta:** Dr. Abel Gutiérrez Ortega.  
**Asesor:** Dr. Moisés Martínez Velázquez.



GUADALAJARA, JAL. AGOSTO 2016

EVALUACIÓN IN VITRO DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR  
PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA

---



CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 22 de Julio de 2016

CONSEJO GENERAL DE POSGRADO  
Presente

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Cruz Díaz Luis Antonio**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EVALUACIÓN *IN VITRO* DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA.” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestría Interinstitucional en Ciencia y Tecnología en la opción terminal en Biotecnología Médica Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 22 del mes de julio del año dos mil diez y seis.

Dr. Ernesto Prado Montes de Oca.

*Tutor académico*

Dr. Abel Gutiérrez Ortega.

*Tutor en planta:*

Dr. Moisés Martínez Velázquez.

*Asesor*

---

EVALUACIÓN IN VITRO DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR  
PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA



CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Guadalajara, Jalisco a 10 de Agosto del 2016

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO  
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado del estudiante **Cruz Díaz Luis Antonio**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EVALUACIÓN *IN VITRO* DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestría Interinstitucional en Ciencia y Tecnología en la opción terminal en Biotecnología Médica Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al 10 del mes de Agosto del año 2016

Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez  
*Presidente*

Dra. Rocío del Carmen Chávez Álvarez  
*Secretario*

Dr. Ernesto Prado Montes de Oca  
*Vocal*

**TÍTULO**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE  
FUNCIONALES EN PROMOTOR PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A  
TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA.

**Presenta:** Ing. En Biotecnología Cruz Díaz Luis Antonio.

**Tutor académico:** Dr. Ernesto Prado Montes de Oca.

**Tutor en planta:** Dr. Abel Gutiérrez Ortega.

**Asesor:** Dr. Moisés Martínez Velázquez.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>3. FUNDAMENTACIÓN</b> .....	7
3.1. Tuberculosis.....	7
3.1.1. Diagnóstico de TB .....	7
3.1.2. Tratamiento de TB.....	7
3.2. Péptidos antimicrobianos .....	7
3.2.1. Producción y secreción de APs en el ser humano .....	8
3.2.1.1. $\beta$ -defensina humana 1 .....	8
3.2.1.2. Catelicidina LL-37 .....	9
4.3. Línea celular A-549 .....	9
4.4. Secuencia promotor .....	10
4.5. Polimorfismos de un solo nucleótido.....	10
4.6. Factor de transcripción y sitios de unión a factores de transcripción (TFs y TFBSs).11	
4.7. Proyecto de la Enciclopedia de los elementos del ADN “The Encyclopedia of DNA Elements” (ENCODE).....	12
4.8 Vector de clonación .....	13
4.8.1 Vector reportero pCAT.....	13
<b>4. DEFINICIÓN DEL PROYECTO</b> .....	14
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>7. OBJETIVO</b> .....	17
<b>8. PROCEDIMIENTOS</b> .....	18
8.1 Primera etapa; generación de vectores de clonación. ....	19
8.1.1 Evaluación <i>in silico</i> de los genes asociados o involucrados en respuesta inmune en contra de TB y VIH.....	19
8.1.2. Elaboración de constructos plasmídicos y mutagénesis dirigida. ....	19
8.2 Segunda etapa: análisis <i>in-vitro</i> . ....	20
8.2.1 Cultivo celular y transfección. ....	20
8.2.2 PCR en tiempo real. ....	21
8.2.3 Análisis estadístico.....	22

<b>9. RESULTADOS</b> .....	23
9.1 Predicción <i>in silico</i> de SNPs regulatorios putativamente funcionales.....	23
9.2 Construcción de plásmidos y mutagénesis dirigida.....	24
9.2.1 Promotor proximal del gen <i>CAMP</i> .....	24
9.2.2 Promotor proximal del gen <i>DEFBI</i> . ....	25
9.3 Transfecciones y PCR tiempo real.....	28
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	37
<b>11. CONCLUSIONES</b> .....	41
<b>12. RECOMENDACIONES</b> .....	43
<b>13. ANEXOS</b> .....	46
13.1. Secuencias nucleotídicas de los vectores y promotores utilizados. ....	46
13.1.1. Vector pUC57 (2710 pb).....	46
13.1.2. Vector pCAT Basic Vector (4027 pb).....	47
13.1.3. Promotor del gen <i>DEFBI</i> (2000 pb). ....	51
13.1.4. Promotor del gen <i>CAMP</i> (2000 pb).....	52
<b>14. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. TASAS DE INCIDENCIA DE TB A NIVEL GLOBAL [4]. .....	2
FIGURA 2. DIAGRAMA DE VENN DE LA RELACIÓN ENTRE LOS GENES Y LAS ENFERMEDADES. ....	5
FIGURA 3. <i>M. TUBERCULOSIS</i> EN FROTIS DE ESPUTO TEÑIDO. TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN [45]...	7
FIGURA 4. INCIDENCIA Y MUERTES POR TUBERCULOSIS Y EN RELACIÓN A VIH/SIDA [4]. .....	7
FIGURA 5. REGIONES REGULADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS [69]. ....	10
FIGURA 6. POLIMORFISMOS DE UN NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs) [71]. .....	11
FIGURA 7. (A) UNA SECUENCIA PROMOTORA DE UN GEN QUE PRESENTA UN SNP EN ALELO MAYOR, INTERACCIONA CON LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, QUE A SU VEZ, RECLUTAN A LA RNA POLIMERASA NECESARIA PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN. SIN EMBARGO, (B) SI EN UNA SECUENCIA PROMOTORA EL MISMO SNP SE ENCUENTRA EN UN ALELO MENOR, ESTO PODRÍA OCASIONAR UNA ALTERACIÓN EN LA AFINIDAD DE LA SECUENCIA PROMOTORA CON LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, QUE A SU VEZ, REPRESENTA UNA ALTERACIÓN EN EL RECLUTAMIENTO DE LA RNA POLIMERASA, Y AL FINAL ESTO PODRÍA OCASIONAR UN AUMENTO O DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN. ....	12
FIGURA 8. IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN <i>CAMP</i> DESPUÉS DE LA DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN <i>XhoI</i> Y <i>SacI</i> . LÍNEA 1: VECTOR pUC57 CON EL PROMOTOR (TAMAÑOS ESPERADOS: 2710 PB PARA EL VECTOR pUC57 Y 2000 PB PARA EL PROMOTOR). LÍNEA 2: VECTOR pCAT-BÁSICO (TAMAÑO ESPERADO: 4027 PB). (M=100 BP-12,000 BP, 1 Kb PLUS DNA LADDER, INVITROGEN). ....	24
FIGURA 9. IDENTIFICACIÓN DE LA LIGACIÓN DEL VECTOR pCAT-BÁSICO CON EL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN <i>CAMP</i> . LÍNEA 1, 2, 3 Y 4: DIFERENTES PRODUCTOS DE LIGACIÓN pCAT- <i>CAMP</i> (TAMAÑO ESPERADO: 6027 PB). LÍNEA 5: VECTOR pCAT-BÁSICO (TAMAÑO ESPERADO: 4027 PB). (M=100 BP-12,000 BP, 1 Kb PLUS DNA LADDER, INVITROGEN). ....	25
FIGURA 10. IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN <i>DEFBI</i> DESPUÉS DE LA DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN <i>XhoI</i> Y <i>SacI</i> . LÍNEA 1: VECTOR pUC57 CON EL PROMOTOR (TAMAÑOS ESPERADOS: 2710 PB PARA EL VECTOR pUC57 Y 2000 PB PARA EL PROMOTOR). LÍNEA 2: VECTOR pCAT-BÁSICO (TAMAÑO ESPERADO: 4027 PB). (M=100 BP-12,000 BP, 1 Kb PLUS DNA LADDER, INVITROGEN). ....	26
FIGURA 11. CONFIRMACIÓN DE LA LIGACIÓN DEL VECTOR pCAT-BÁSICO CON EL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN <i>DEFBI</i> . LÍNEA 1: PRODUCTO DE LA LIGACIÓN pCAT- <i>DEFBI</i> (TAMAÑO ESPERADO: 6027 PB). LÍNEA 2 Y 3: VECTOR pCAT-BÁSICO (TAMAÑO ESPERADO: 4027 PB). (M=100 BP-12,000 BP, 1 Kb PLUS DNA LADDER, INVITROGEN). ....	26
FIGURA 12. CONFIRMACIÓN DE PRODUCTOS MUTAGÉNICOS. LÍNEA 1: pCAT- <i>DEFBI</i> -182, LÍNEA 2: pCAT- <i>DEFBI</i> -179 Y LÍNEA 3: pCAT- <i>DEFBI</i> -417 (TAMAÑO ESPERADO PARA LOS PRODUCTOS DEL PROCESO MUTAGÉNICO: 6027 PB). LÍNEA 4: VECTOR pCAT-BÁSICO (TAMAÑO ESPERADO: 4027 PB). (M=100 BP-12,000 BP, 1 Kb PLUS DNA LADDER, INVITROGEN). .....	27
FIGURA 13. CONFIRMACIÓN DEL CAMBIO DE PAR DE BASE DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA. CADA POSICIÓN DE SNP ESTÁ INDICADA CON UN CÍRCULO AMARILLO EN LA SECUENCIA DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN <i>DEFBI</i> Y EN EL CROMATOGRAMA. EL CAMBIO DE PAR DE BASE PARA LOS SNPs RS5743417 Y RS2738182	

FUE EXITOSA. SIN EMBARGO, EL CAMBIO DE PAR DE BASE PARA EL SNP rs2738179 NO FUE SATISFACTORIO. ....	28
FIGURA 14. EXPRESIÓN GENÉTICA RELATIVA EN LA LÍNEA CELULAR A549 TRANSFECTADA CON LOS DIFERENTES PROMOTORES DEL GEN <i>DEFB1</i> . EL GRUPO DE REFERENCIA FUE pCAT- <i>DEFB1</i> Y LOS VALORES SIGNIFICATIVOS DE LAS PRUEBAS <i>t</i> -STUDENT SON REPRESENTADOS COMO $*=P < 0.05$ . ....	28
FIGURA 15. POSICIÓN DEL SNP rs5743417 EN PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN <i>DEFB1</i> . LA SECUENCIA QUE ESTÁ MARCADA CON COLOR PURPURA CORRESPONDE AL INICIO DEL GEN <i>DEFB1</i> . EL NUCLEÓTIDO QUE ESTÁ MARCADO CON UNA LÍNEA ROJA CORRESPONDE AL SNP rs5743417. ....	29
FIGURA 16. OTROS POLIMORFISMOS NO FUNCIONALES EXCLUIDOS CON NUESTRO MÉTODO <i>IN SILICO</i> EN EL ENTORNO GENÓMICO LINEAL DE rs5743417 (SUBRAYADO Y RESALTADO EN ROJO). ....	30
FIGURA 17. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA QUE ES POSIBLEMENTE CAUSADA POR LA PRESENCIA DEL SNP rs5743417. (A) CUANDO LA SECUENCIA PROMOTORA PRESENTA LOS ALELOS MAYORES, LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SREBF1 Y CREB1, PUEDEN INTERACTUAR ADECUADAMENTE CON LA SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DEL PROMOTOR; ESTO PERMITE LA EXPRESIÓN SUFICIENTE DEL PÉPTIDO B-DEFENSINA HUMANA 1 QUE PODRÍA DISMINUIR EL DESARROLLO DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> . (B) CUANDO EL PROMOTOR PRESENTA EL ALELO MENOR (SNP rs5743417), LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SREBF1 Y CREB1 NO PUEDEN INTERACTUAR ADECUADAMENTE CON EL SITIO DE RECONOCIMIENTO DEL PROMOTOR, ESTO PUEDE OCASIONAR LA ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>DEFB1</i> QUE, A SU VEZ, PODRÍA DISMINUIR LA CANTIDAD DEL PÉPTIDO B-DEFENSINA HUMANA 1; POR LO TANTO, <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> PUEDE DESARROLLARSE ADECUADAMENTE EN AUSENCIA DE UNA RESPUESTA INMUNE INNATA EFECTIVA. ....	32
FIGURA 18. PORCENTAJES DE LAS POBLACIONES EN DONDE EL SNP rs5743417 SE ENCUENTRA PRESENTE. PUR: POBLACIÓN PUERTORRIQUEÑA, AFR: POBLACIÓN AFRICANA. (ENSEMBL, <a href="http://www.ensembl.org/HOMO_SAPIENS/VARIATION/EXPLORE?DB=CORE;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=VARIATION;vf=3112547">HTTP://WWW.ENSEMBL.ORG/HOMO_SAPIENS/VARIATION/EXPLORE?DB=CORE;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=VARIATION;vf=3112547</a> ). ....	38
FIGURA 19. PORCENTAJES DE LAS POBLACIONES AFRICANAS EN DONDE EL SNP rs5743417 SE ENCUENTRA PRESENTE. ACB: POBLACIÓN EN BARBADOS, ASW: POBLACIÓN EN EL SURESTE DE US, ESN: POBLACIÓN EN ESAN, GWD: POBLACIÓN EN GAMBIA, LWK: POBLACIÓN EN KENIA, MSL: POBLACIÓN EN SIERRA LEONE, YRI: POBLACIÓN EN NIGERIA. (ENSEMBL, <a href="http://www.ensembl.org/HOMO_SAPIENS/VARIATION/EXPLORE?DB=CORE;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=VARIATION;vf=3112547">HTTP://WWW.ENSEMBL.ORG/HOMO_SAPIENS/VARIATION/EXPLORE?DB=CORE;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=VARIATION;vf=3112547</a> ). ....	38
FIGURA 20. POSIBLE ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA, QUE ES PROBABLEMENTE CAUSADA POR LA PRESENCIA DEL SNP rs9844566. (A) CUANDO LA SECUENCIA PROMOTORA PRESENTA LOS ALELOS MAYORES, LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX2 Y FOXP2, PUEDEN INTERACTUAR ADECUADAMENTE CON LA SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DEL PROMOTOR; ESTO PERMITE LA EXPRESIÓN SUFICIENTE DEL PÉPTIDO CATELICIDINA LL-37 QUE PODRÍA DISMINUIR EL DESARROLLO DE <i>MYCOBACTERIUM</i>	



*TUBERCULOSIS*. (B) CUANDO EL PROMOTOR PRESENTA EL ALELO MENOR (SNP rs9844566).  
LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX2 Y FOXP2 NO PUEDEN INTERACTUAR  
ADECUADAMENTE CON EL SITIO DE RECONOCIMIENTO DEL PROMOTOR, ESTO PUEDE  
OCASIONAR LA ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL GEN *CAMP* QUE, A SU VEZ, PODRÍA  
DISMINUIR LA CANTIDAD DEL PÉPTIDO LL-37; POR LO TANTO, *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* PUEDE DESARROLLARSE ADECUADAMENTE EN AUSENCIA DE UNA RESPUESTA  
INMUNE INNATA EFECTIVA. ....45

## ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL PROCESO DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	20
TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR TIEMPO REAL.....	21
TABLA 3. LISTADO DE SNPs CON MAYOR PROBABILIDAD DE ALTERAR LA EXPRESIÓN GÉNICA..	23
TABLA 4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS CON LA VERSIÓN 1 DEL SOFTWARE SNP CLINIC. GENES REFERENTES A TB Y VIH, EN LAS LÍNEAS CELULARES A549, T <sub>H</sub> 1 Y HL60. ....	34
TABLA 5. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA VERSIÓN BETA Y 1 DEL SOFTWARE SNP CLINIC, CONSIDERANDO; LA LÍNEA CELULAR A549 Y LA ACTUALIZACIÓN GRCH37. ....	35
TABLA 6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS CON LA VERSIÓN 1 DEL SOFTWARE SNP CLINIC, BASADOS EN UN GRUPO MEXICANO EN LOS ÁNGELES, CALIFORNIA. GENES REFERENTES A TB Y VIH, EN LAS LÍNEAS CELULARES A549, T <sub>H</sub> 1 Y HL60.....	36
TABLA 7. COMPARACIÓN DE LOS DATOS POBLACIONALES CON RESPECTO A TB Y VIH [46]. ....	39

## 1. RESUMEN

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas y prevalentes en la historia del ser humano. Un número creciente de personas en el mundo contraen tuberculosis, debido en un porcentaje considerable, a que su sistema inmune se ve comprometido por diversos factores, entre los que destaca una infección previa con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH/SIDA).

Estudios recientes han identificado genes asociados como biomarcadores para diferentes estadios de TB. Además de esto, los péptidos antimicrobianos como  $\beta$ -defensina 1 humana (hBD-1) y catelicidina LL-37, son activos *in vitro* en contra de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudios recientes sugieren que los SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) localizados en las regiones promotoras de péptidos antimicrobianos y de genes asociados a la progresión de la patología, aumentan la susceptibilidad a enfermedades como tuberculosis y VIH/SIDA.

Gracias a los avances sobre la estructura, funcionamiento e interacciones del genoma humano, se buscan alternativas para predecir y por tanto prevenir diversas enfermedades, aunque las limitantes del conocimiento actual han hecho que esto parezca un objetivo difícil de alcanzar.

En nuestro grupo de investigación identificamos algunos SNPs en promotor proximal de genes asociados como biomarcadores o en respuesta inmune en contra de tuberculosis y VIH/SIDA que podrían ser factores importantes en la susceptibilidad a dichas enfermedades. Además, sugerimos que el SNP rs5743417 en el promotor proximal del gen *DEFB1* podría representar un factor de riesgo a la susceptibilidad de tuberculosis y su asociación con VIH/SIDA, especialmente en población africana así como en población puertorriqueña. Debido a que este SNP altera los sitios de unión a factor de transcripción (TFBSs) SREBF1 y CREB1 en el promotor proximal de *DEFB1* y traslapa con gen miRNA ENSG00000245857.

## 2. ANTECEDENTES

La tuberculosis representa una emergencia de salud a nivel global, más de 9.6 millones de nuevos casos se reportan cada año y un poco más de 1.5 millones terminan en muerte [1]. De entre éstas, 400 000 están relacionadas con un diagnóstico seropositivo de VIH, lo que representa un 26% del total de muertes causadas en conjunto con tuberculosis [2]. En México la situación no es diferente, se registraron 26 000 nuevos casos de TB en el año 2012 [3], lo que representa una incidencia de 23/100,000 habitantes.

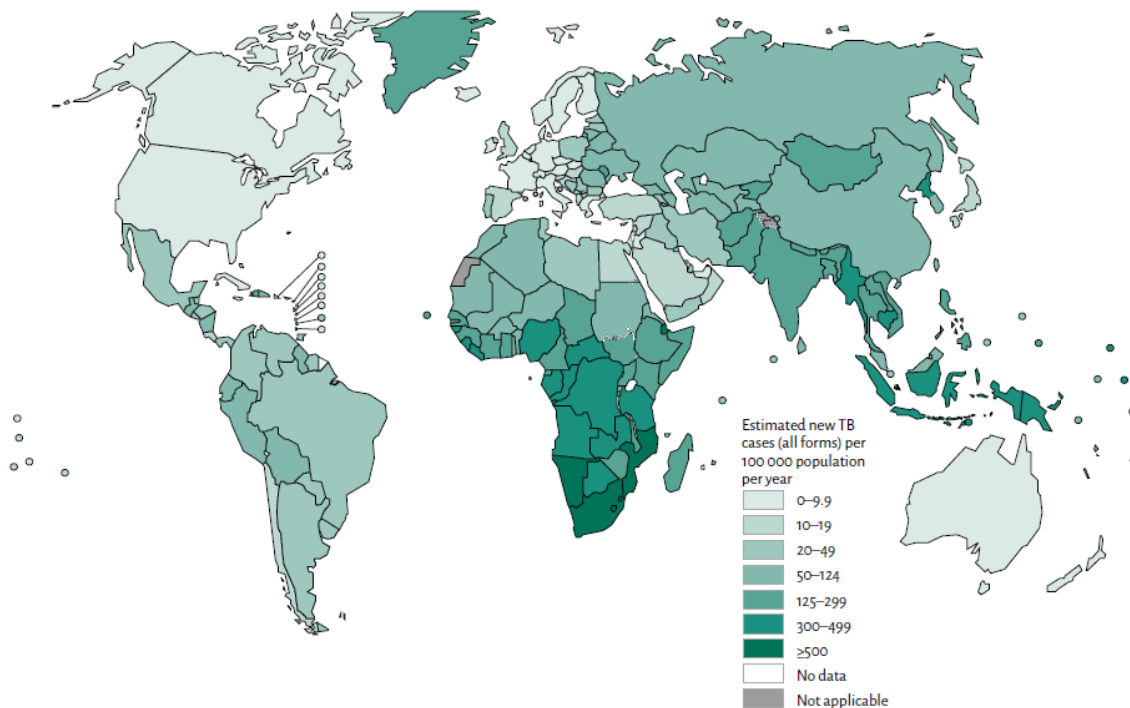


Figura 1. Tasas de incidencia de TB a nivel global [4].

Estudios recientes han identificado genes asociados como biomarcadores para diferentes estadios de TB. Interferón- $\gamma$  (*IFNG*) es un importante mediador inmunológico en la defensa de un individuo, y es considerado como biomarcador de TB latente [5]. Además, se han sugerido algunos polimorfismos SNPs en el gen *IFNG* como factores importantes en la susceptibilidad a TB en población china [6], [7].

El gen de nexina seleccionadora 17 (*SNX17*) es un factor que participa en TB al estar involucrado en la disminución de selectina P [8]; teniendo en cuenta que los niveles séricos de selectina P en pacientes con TB son significativamente más altos que los niveles de sujetos control en población japonesa, se ha sugerido que selectina P posiblemente participe en la

patogénesis de TB [9]. Además de que el gen *SNX17* se ha propuesto como biomarcador para TB latente [10]. El gen amfipicina (*AMPH*) también es sugerido como biomarcador de TB latente [10] y biomarcador de meningitis tuberculosa [11]. Además que se ha demostrado que la molécula amfipicina tiene una importante participación en la fagocitosis de macrófagos alveolares [12], lo que podría ser fundamental en la respuesta en contra de *Mycobacterium tuberculosis*.

La biogénesis del fagolisosoma es un proceso importante en la respuesta contra *Mycobacterium tuberculosis*, por esta razón este agente patógeno inhibe la fusión del fagosoma y el lisosoma [13]. Ahora bien, la formación del fagolisosoma es un proceso regulado por calcio, de ahí la importancia del gen de la proteína de unión a calcio *S100* (*S100P*), ya que se sabe que el producto de este gen está involucrado en la homeostasis del calcio. Además de que *S100P* está relacionado como biomarcador en TB activa [10]. Otro gen sugerido como biomarcador en TB activa es el gen de hemoglobina delta (*HBD*) cuya proteína está involucrada en el transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos periféricos [10].

Estudios de asociación genética han determinado que el locus 1p13.3 está implicado en el metabolismo del colesterol. En este locus se encuentran los genes *CELSR2* y *PSRC1* [14], estos genes también son sugeridos como biomarcadores de TB latente [10]. Se conoce además que *M. tuberculosis* puede utilizar el colesterol del individuo para liberar carbono y la energía necesaria para sobrevivir [15]. Se sabe que los niveles bajos de colesterol favorecen el desarrollo y proliferación de *M. tuberculosis*, esto debido a que el colesterol es esencial en la degradación de la micobacteria por medio de macrófagos [16]. Además de esto, es importante mencionar que SNPs en los genes *CELSR2* y *PSRC1* correlacionan con niveles bajos de colesterol en estudios de población hindú [17].

Estudios *in vitro* demostraron el papel supresor de *IL10* al ser un inhibidor directo de la replicación viral [18]. Más importante aún, un estudio *in vivo* mostró el efecto inhibidor de *IL10* en la infección aguda por VIH [19]. Sumado a la importancia de este gen, se han sugerido polimorfismos asociados a factor de riesgo a TB en población asiática y europea [20].

Otro gen que se ha propuesto como biomarcador en tuberculosis activa es el gen correspondiente al factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ), debido a que en estas condiciones

el organismo humano sobre expresa el gen [21]. Así mismo se conoce que el factor de necrosis tumoral alfa participa en la respuesta inmune en contra de tuberculosis al interactuar con macrófagos y células T [22], aunque esta contribución es inferior comparada con otras moléculas como lo son algunos péptidos antimicrobianos.

Existen genes propuestos como factores que influyen en la susceptibilidad al contagio del virus VIH/SIDA y la micobacteria *M. tuberculosis*. Estudios recientes sugieren que polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en las regiones promotoras de genes de péptidos antimicrobianos, pueden generar una susceptibilidad a enfermedades causadas por micobacterias como tuberculosis extrapulmonar [23] y por VIH/SIDA [24]. De entre estos genes y sus productos resalta la presencia de los péptidos antimicrobianos  $\beta$ -defensina 1 humana (hBD-1) y catelicidina LL-37, los cuales destacan por su actividad *in-vitro* en contra de *Mycobacterium tuberculosis* [25]–[28]. Primeramente, LL-37 es considerado como un biomarcador a TB activa [29]. Además, LL-37 inhibe la replicación de VIH y el desarrollo de TB, debido a que LL-37 tiene un papel importante en los procesos de autofagia [30].

Investigaciones recientes han identificado polimorfismos en el gen  $\beta$ -defensina 1 humana (*DEFB1*) que modulan el riesgo a la infección y progresión de la enfermedad causada por VIH/SIDA en población mexicana [31]. Además de que la influencia de SNPs en regiones no codificantes del gen *DEFB1* son propuestos como factores de susceptibilidad a tuberculosis extra pulmonar y pulmonar en población mexicana [23] y china respectivamente [32].

Un gen que en estudios previos se ha relacionado en la respuesta inmune en contra de la infección de VIH, es el factor inducible por hipoxia 1 alfa (*HIF1A*). Se sabe que este gen juega un papel importante en la regulación de la replicación del VIH, al mantener bajo control la expresión de la proteína Vpr [33], aunque se necesitan más estudios para determinar cuál es el mecanismo de este proceso.

Con esta información reportada previamente, se generó un diagrama de Venn en donde simplificamos la relación de los genes con respecto a las enfermedades de estudio. (Ver figura 2).

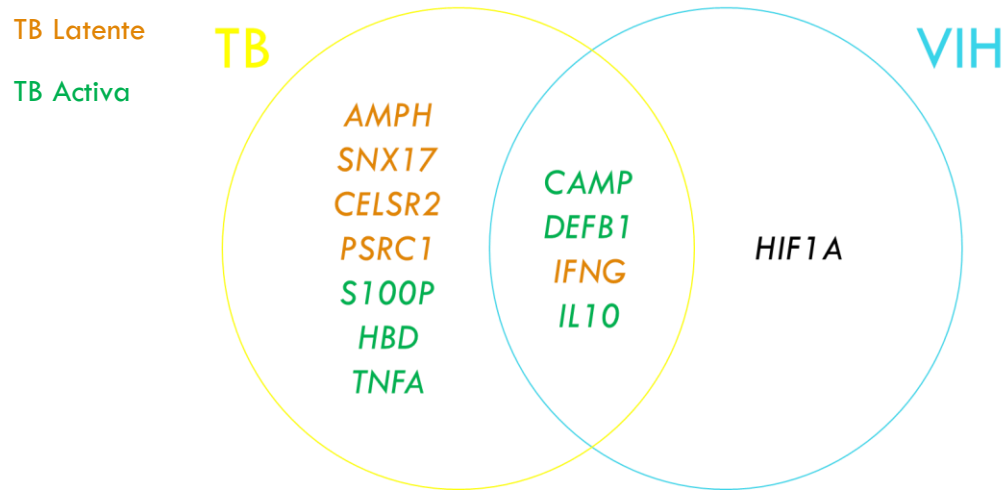


Figura 2. Diagrama de Venn de la relación entre los genes y las enfermedades.

La secuencia del genoma humano se consideraba una labor completada, donde se sugería que muchas enfermedades se podrían fácilmente predecir y por tanto prevenir. Sin embargo, los resultados obtenidos del proyecto de investigación internacional ENCODE, (por sus siglas en inglés “*The Encyclopedia of DNA Elements*”), sugieren que los esfuerzos de mapeado se encuentran en un 50% de ser completados, sin mencionar que la caracterización profunda de todo el genoma humano está terminada probablemente en un 10% [34]. Sumado a esto un gran número de variables biológicas y sus múltiples posibilidades de interacción, la temporalidad de la expresión génica y las especificidades de tejido, entre otras complejidades como lo son los elementos epigenéticos [35], han hecho que la predicción de un fenotipo clínico específico parezca un objetivo difícil de alcanzar.

Una de las estrategias más relevantes reportadas en la actualidad, es que a partir de SNPs con resultados positivos en estudios de asociación de genoma completo (GWAS), se analicen SNPs ligados por vecindad con SNPs putativamente funcionales [36]. La deficiencia de este estudio es que sólo se pueden tomar aquellos marcadores presentes en microarreglos comercialmente disponibles o los cercanos a éstos, lo que aumenta la posibilidad de pasar por alto SNPs con repercusión funcional; como por ejemplo, lo ocurrido con el polimorfismo rs1800972 que correlaciona con una menor expresión de *DEFB1* (que codifica para hBD-1) [37], haciendo susceptible al portador del mismo a lepra lepromatosa [38], [39] y a tuberculosis extrapulmonar [23].

Este grupo de investigación ha desarrollado un método [40] y software (SNP Clinic) [41] que permite estimar el impacto de polimorfismos en promotores de genes humanos. Los resultados de este trabajo indican que los SNPs en los promotores proximales (-2kb del sitio de inicio de la transcripción) alteran la afinidad en TFBSs del gen y a su vez, esto impacta en la expresión del gen de estudio. Además, nuestro grupo realizó por primera vez la predicción *in silico* de que HIF-1 $\alpha$  regulaba el gen *DEFB1* [42], posteriormente demostrado *in vitro* [43]. Asimismo, este grupo de investigación publicó el primer estudio de asociación de polimorfismos en el gen *CAMP* enfocado a la enfermedad de tuberculosis y fue reportado por primera vez que el polimorfismo rs1800972 en *DEFB1* está asociado a tuberculosis extrapulmonar. Estos resultados sugieren que este polimorfismo funcional pudiera ser útil como marcador y/o blanco terapéutico para esta enfermedad [23].



### 3. FUNDAMENTACIÓN

#### 3.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta comúnmente a los pulmones (TB pulmonar), pero puede afectar otros sitios del organismo (TB extrapulmonar). La enfermedad es propagada en el aire cuando personas enfermas con TB pulmonar expelen la bacteria, por ejemplo por tos [44]. (Ver figura 3).

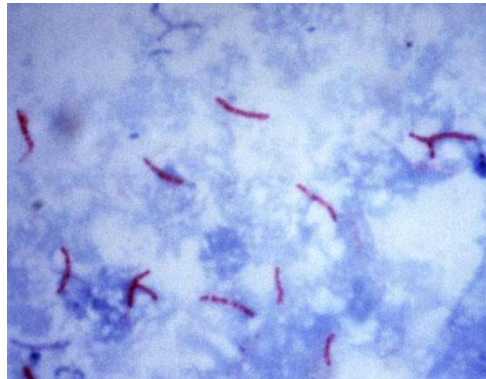


Figura 3. *M. tuberculosis* en frotis de esputo teñido. Técnica de Ziehl-Neelsen [45].

En general, una proporción relativamente baja de personas infectadas con *M. tuberculosis* (TB latente) desarrolla la enfermedad (TB activa), sin embargo, la probabilidad de desarrollar TB es mucho más alta en personas infectadas con VIH/SIDA. La TB es también más común en hombres que en mujeres, y afecta generalmente a adultos en grupos de edad económicamente productiva [44]. (Ver figura 4).

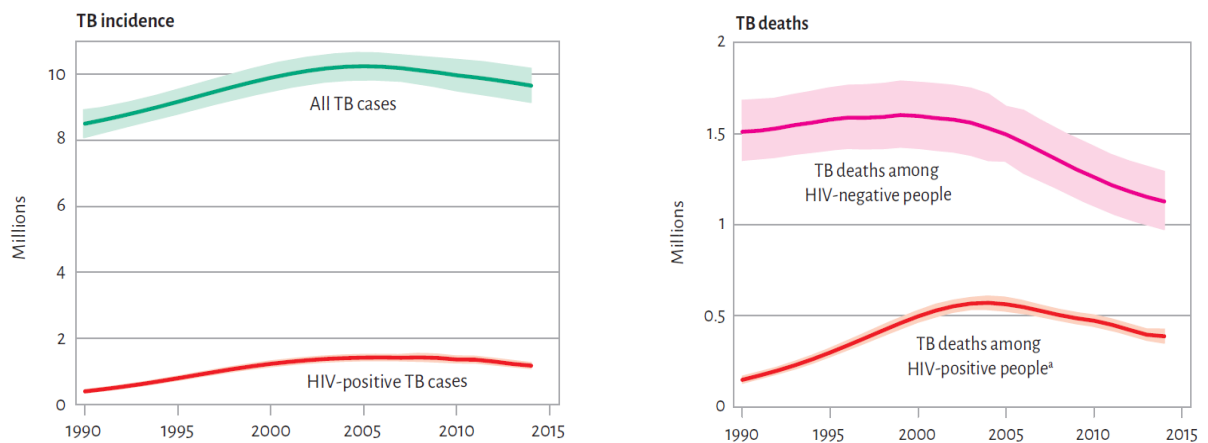


Figura 4. Incidencia y muertes por tuberculosis y en relación a VIH/SIDA [4].

### 3.1.1. Diagnóstico de TB

El método más común para el diagnóstico de TB a nivel mundial es la baciloscopía de esputo (desarrollado hace más de 100 años), en el cual la bacteria es observada en muestras de esputo bajo un microscopio. Los recientes avances en el diagnóstico de TB, han incrementado el uso de pruebas moleculares rápidas y pruebas de fármaco-resistencia a TB. En países con mayor desarrollo en la capacidad de sus laboratorios, los casos de TB también se diagnostican vía métodos de cultivo (estándar de referencia actual) [46].

### 3.1.2. Tratamiento de TB

Los fármacos para el tratamiento efectivo fueron desarrollados por primera vez a partir de 1940. La primera línea de fármacos anti-TB más efectiva (rifampicina), estuvo disponible en el año de 1960. El tratamiento actualmente recomendado para los nuevos casos de TB fármaco-susceptible consiste en un régimen de seis meses con las cuatro primeras líneas de fármacos anti-TB: isoniazida, rifampicina, etambutol y pyrazinamida, tratamiento con una tasa de éxito del 85%. El tratamiento para TB fármaco-resistente, definida así por su resistencia a isoniazida y rifampicina (los dos fármacos anti-TB más poderosos), es más largo y requiere fármacos más caros y tóxicos; para pacientes con este tipo de cepa el régimen de tratamiento recomendado dura 20 meses, y la tasa de tratamiento exitoso es mucho más baja [46].

## 3.2. Péptidos antimicrobianos

Diferentes mecanismos de defensa presentes en los organismos multicelulares, interactúan entre sí con el fin de la sobrevivencia en un mundo repleto de microorganismos. El primer contacto entre el hospedero y los organismos patógenos generalmente ocurre en las mucosas o la superficie del cuerpo, es en estos sitios donde se suscita la primera línea de defensa, el sistema inmunitario innato; donde gracias a la síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos (APs por sus siglas en inglés: Anti-Microbial Peptides) se logra crear una barrera que impide la proliferación de las infecciones [47].

Los APs son principalmente moléculas catiónicas cuya estructura predominantemente anfipática, les permite interactuar con bicapas lipídicas, principalmente aquellas que forman las membranas citoplasmáticas de patógenos; o afectando blancos internos, como la

replicación del ADN y la síntesis de proteínas, e interactuando con el hospedero con funciones inmunomoduladoras de la regulación del proceso inflamatorio y de la cicatrización [48].

### 3.2.1. Producción y secreción de APs en el ser humano

La producción de APs en el cuerpo humano se realiza en diferentes tipos celulares, teniendo entre estos; granulocitos epiteliales del intestino delgado productores de  $\alpha$ -defensinas como HD-5 y HD-6 [49], en hemofiltrados y células epiteliales respiratorias (generadoras de  $\beta$ -defensina-1 “hBD-1”) [50], [51], en células propias de piel “queratinocitos” se han identificado diferentes  $\beta$ -defensinas [52], inclusive, se han detectado APs como catelicidina LL-37 en linfocitos y células Natural Killer “NK” [53]. Todos estos compuestos son parte importante en la generación de una barrera primaria contra patógenos.

#### 3.2.1.1. $\beta$ -defensina humana 1

La primera  $\beta$ -defensina (hBD-1), fue identificada en 1995 y purificada del plasma de pacientes con enfermedad renal [54]. Esta molécula es sintetizada por medio de un pre péptido de 68 aminoácidos y al concluir su maduración el péptido consta de 48 aminoácidos. El nombre del gen que codifica para hBD-1 es *DEFB1* y se localiza en el cromosoma 8 [55].

Se ha demostrado expresión de hBD-1 en queratinocitos de piel normal y en lesiones causadas por enfermedades de la piel. También es producida en células epiteliales de componentes del sistema respiratorio como; tráquea, bronquios, células propias de pulmón, así como en mucosa bucal. Además, hBD-1 es expresada en epitelios de intestino delgado, páncreas, riñón, próstata, testículo, vagina, útero y placenta [55].

Este péptido antimicrobiano juega un papel importante en el control de la flora microbiana en superficies epiteliales. En epitelio respiratorio, hBD-1 es expresada tanto en personas sanas como en personas con enfermedades respiratorias [56]. En concentraciones micromolares hBD-1 disminuye el conteo celular de *E. coli* y otras bacterias Gram negativas [57].

Otros reportes sugieren que existe una asociación entre el SNP (44C/G) en el gen *DEFB1* con la infección de VIH en niños italianos [58]. También se ha demostrado que la expresión de hBD-1 es significativamente reducida en macrófagos alveolares de pacientes infectados con VIH [59]. Inclusive, se ha demostrado asociación entre los SNPs del gen codificante para hBD-1 y la susceptibilidad a tuberculosis pulmonar en pacientes de población China [60]. Por

todas estas razones, hBD-1 y su gen *DEFB1*, es uno de los péptidos antimicrobianos más ampliamente estudiados.

#### 4.2.1.2. Catelicidina LL-37

LL-37 es el único péptido antimicrobiano derivado de las catelicidinas, descubierto en células del ser humano. Ésta corresponde a la clase de APs de hélice- $\alpha$ , y debe su nombre gracias a sus 37 aminoácidos que conforman el total de su longitud, además de que contiene 2 residuos principales de leucinas. El gen que codifica para este AP es *CAMP* y se localiza en el cromosoma 3 del genoma humano [61].

LL-37 fue primeramente descrito en leucocitos y testículos, sin embargo, ha sido hallado en una gran variedad de células, tejidos y fluidos corporales; se ha demostrado que LL-37 es expresada en médula ósea, piel, epitelios escamosos, epitelio de superficie ocular, membrana sinovial, mucosa nasal, epitelio pulmonar, fluidos de lavado bronquio alveolar, glándulas salivales, epitelio y mucosa de colon [62].

Una amplia gama de actividades biológicas se han atribuido a LL-37, incluidos la acción directa como antimicrobiano y diversas propiedades inmunomoduladoras. Ésta exhibe un amplio espectro de actividad antimicrobiana en contra de bacterias, hongos y virus patógenos. Actualmente, se ha sugerido que los SNPs en el gen codificante de LL-37 (*CAMP*) generan susceptibilidad a tuberculosis [23]. Además, juega un papel importante en el proceso de angiogénesis, actividades quimiotácticas, activación de la producción de monocitos y en la inducción de citocinas y quimiocinas [62]–[64].

#### 4.3. Línea celular A-549

La línea celular A-549 se obtiene de carcinoma alveolar humano [65], comparte la mayoría de características de las células epiteliales alveolares primarias [66]. A-549 tiene un diámetro promedio de  $14.93 \mu\text{m}$  y un volumen estimado de  $1670 \mu\text{m}^3$  [67]. En crecimiento *in-vitro*, esta línea celular se adhiere en forma de monocapa a la superficie del recipiente. Es una de las células mayormente empleadas en análisis *in-vitro*, por sus características de fácil manejo y costo de mantenimiento relativamente bajo.

#### 4.4. Secuencia promotor

Dentro de los principios básicos de la regulación de la transcripción en células eucariotas, se encuentran tres conceptos importantes presentes en las secuencias génicas: intensificadores y silenciadores; secuencias que potencializan o reprimen el proceso de la transcripción, específicos para cada gen, y son regiones del ADN alejadas de la secuencia que regulan, y la región conocida como promotor, localizada por lo general, adyacente al gen (aunque se conoce en la actualidad que muchos promotores se encuentran alejados), estas secuencias nucleotídicas tienen como principal función señalar el comienzo de la transcripción y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula [68].

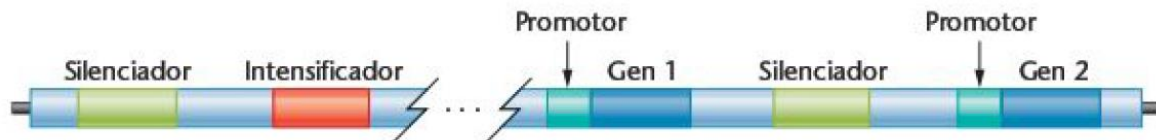


Figura 5. Regiones reguladoras de la transcripción en células eucariotas [69].

Los promotores han dirigido el proceso de evolución por medio de la integración de diferentes mutaciones favorables, para favorecer el desarrollo de los organismos eucariotes en las diferentes condiciones medio ambientales a través de los años. Los promotores son regiones críticas para la regulación genética en genomas complejos y por lo general se localizan corriente arriba de los TSS (Transcription Start Site). La estructura de un promotor está conformada por elementos tales como: caja TATA, caja GC, caja CCAAT, caja BRE y caja INR [69], [70].

#### 4.5. Polimorfismos de un solo nucleótido

Los SNPs (por sus siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphisms) son las variaciones genéticas más comunes presentes en el genoma humano. Cada SNP representa una variación en un solo nucleótido entre genomas de individuos de la misma especie. Para que un SNP sea considerado como tal, es necesario que la variación se presente en al menos el 1% de la población; el genoma del ser humano presenta un SNP por cada 100 a 300 pares de bases [71].

En la actualidad estas variaciones son ampliamente estudiadas por sus posibles repercusiones en la respuesta inmune en contra de microorganismos y en la predisposición a enfermedades; se ha sugerido que los SNPs en las regiones promotoras de ciertos genes de APs generan susceptibilidad a enfermedades como lepra lepromatosa[39], tuberculosis[23] e inclusive, a VIH-SIDA [24].

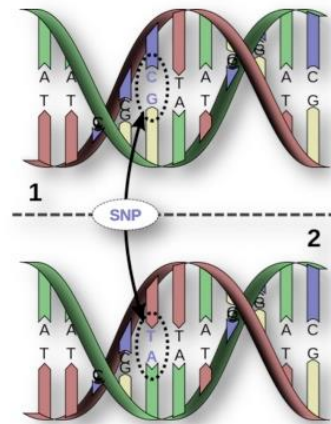


Figura 6. Polimorfismos de un nucleótido simple (SNPs) [71].

#### 4.6. Factor de transcripción y sitios de unión a factores de transcripción (TFs y TFBSs).

Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes [72], [73]. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción [74]. Los factores de transcripción interaccionan con regiones específicas del ADN (llamados sitios de unión a factores de transcripción “TFBSs”), con elementos de la maquinaria de transcripción como la ARN polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad [75]. Conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales [76]. El conjunto de los factores de transcripción de una célula dibuja una red transcripcional cuyas conexiones determinan el conjunto de genes que se expresan en un determinado momento (transcriptoma) [77].

EVALUACIÓN IN VITRO DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA

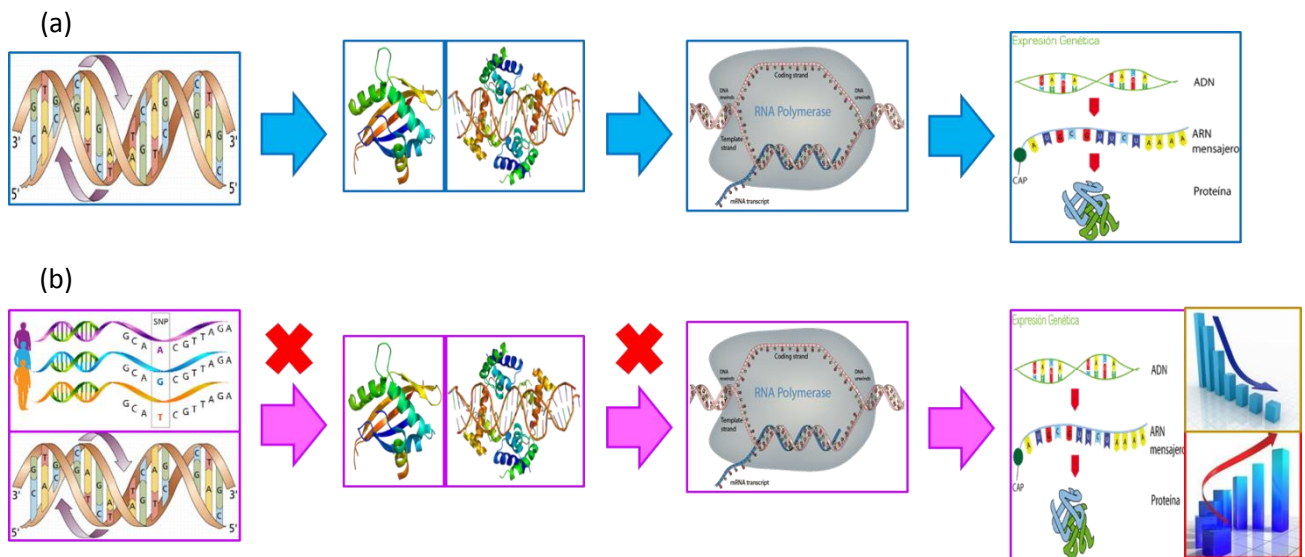


Figura 7. (a) Una secuencia promotora de un gen que presenta un SNP en alelo mayor, interactúa con los factores de transcripción, que a su vez, reclutan a la RNA polimerasa necesaria para la expresión del gen. Sin embargo, (b) si en una secuencia promotora el mismo SNP se encuentra en un alelo menor, esto podría ocasionar una alteración en la afinidad de la secuencia promotora con los factores de transcripción, que a su vez, representa una alteración en el reclutamiento de la RNA polimerasa, y al final esto podría ocasionar un aumento o disminución de la expresión del gen.

4.7. Proyecto de la Enciclopedia de los elementos del ADN “The Encyclopedia of DNA Elements” (ENCODE)

ENCODE es un proyecto de investigación internacional que tiene como objetivo determinar todos los elementos funcionales en la secuencia del genoma humano, esta colaboración internacional de grupos de investigación es financiada principalmente por el Instituto Nacional del Genoma Humano “National Human Genome Research Institute” (NHGRI, <https://www.genome.gov/>) de Estados Unidos. De entre sus principales objetivos es identificar las secuencias funcionales del ADN que actúan a nivel de RNA y posteriormente a proteína, así como determinar los elementos reguladores que controlan la expresión génica en cada una de las diferentes células presentes en el organismo humano [34]. En otras palabras, este proyecto internacional tiene como objetivo, identificar todos los elementos funcionales del genoma humano con una alta resolución y así poder proporcionar toda esta información como un recurso abierto para la comunidad de investigación [78].



El proyecto ENCODE ha permitido identificar cientos de miles de regiones reguladoras y sitios de unión para factores de transcripción en el genoma humano. Este proyecto también ha permitido tener un mejor entendimiento de cómo la accesibilidad de cromatina tiene un papel importante en la expresión genética [79], y en general ha permitido comprender con más detalle lo complejo que es la regulación génica en el ser humano. Una de las mayores aportaciones de este proyecto de investigación internacional es sin duda, el brindar información de cómo los SNPs (Polimorfismos de un Sólo Nucleótido) están asociados a rasgos biológicos importantes, como lo es la susceptibilidad a enfermedades [35], [79]. Esto es lo que ha permitido desarrollar herramientas que permitirán en un futuro prevenir y tratar enfermedades basándose en la información genética.

#### 4.8 Vector de clonación

Los vectores son moléculas transportadoras de DNA que transfieren y replican (clonan) fragmentos de DNA insertados. Existen diversos vectores de clonación, que difieren en la especificidad de la célula hospedero, el tamaño de los insertos que pueden transportar, entre otras características, como el número de copias que producen, el número de secuencias de reconocimiento disponibles para la clonación y el número y tipo de genes marcadores o de expresión. En general, para que una molécula de DNA sirva de vector de clonación, ésta debe ser capaz de replicarse independientemente junto con el fragmento de DNA que transporta [68].

##### 4.8.1 Vector reportero pCAT

El vector pCAT, llamado así por utilizar como gen de expresión el gen *cat* (gen codificante para cloranfenicol acetiltransferasa), es ampliamente utilizado para el análisis cuantitativo de factores que potencialmente regulan la expresión de genes de mamífero, tales como promotores e intensificadores. A excepción de la inclusión de promotores e intensificadores, los diferentes vectores pCAT son estructuralmente idénticos. El vector básico pCAT carece de secuencias promotoras e intensificadoras, permitiendo máxima flexibilidad en la clonación putativa de secuencias reguladoras. La expresión de *cat* activa en células transfectadas con este plásmido depende de la apropiada inserción y orientación de un promotor funcional [80].



#### 4. DEFINICIÓN DEL PROYECTO

La tuberculosis es una emergencia de salud a nivel mundial que se encuentra en crecimiento constante; sumado a esto, la relación TB/VIH/SIDA aumenta considerablemente la cifra de muertes anuales causadas por estas dos enfermedades.

Estudios recientes han identificado genes que participan activamente en la respuesta inmunitaria contra la tuberculosis y el VIH/SIDA; o genes con potencial para ser utilizados como marcadores genéticos para el diagnóstico clínico de estas dos enfermedades. Algunos de estos genes son *IFNG*, *IL10*, *SNX17*, *AMPH*, *CELSR2*, *PSRC1*, *HIF1A*, *HBD*, *TNFA* y *S100P*, los cuales fueron analizados en el transcurso de este proyecto. Además, investigaciones previas indican que los péptidos antimicrobianos  $\beta$ -defensina 1 humana (hBD-1) y catelicidina LL-37, presentan actividad *in-vitro* en contra de *Mycobacterium tuberculosis*, así como el gen *DEFB1* (gen de hBD-1) se ha sugerido estar asociado a la susceptibilidad de contraer TB y VIH.

En años anteriores se pensó que la secuencia del genoma humano era una labor completada, y por tanto muchas enfermedades se podrían predecir y prevenir, sin embargo, los resultados del proyecto de la Enciclopedia de Elementos Codificantes del DNA (ENCODE), así como el gran número de variables biológicas que interactúan en la expresión génica, alejan a los investigadores de la posibilidad de obtener un fenotipo clínico específico funcional. Por estas razones es importante colaborar en la obtención de una metodología capaz de brindar una alternativa eficaz, en la prevención y tratamiento de enfermedades, utilizando los últimos avances referentes a la genómica humana.

Se analizó a nivel *in-vitro* la funcionalidad de SNPs en el promotor proximal del gen *DEFB1*, como posibles causantes y/o biomarcadores genéticos de susceptibilidad a TB y VIH/SIDA. Estos polimorfismos fueron seleccionados por un software desarrollado por el grupo de investigación (SNP-Clinic), por lo que los resultados de este estudio confirmaron la utilidad y funcionalidad del programa computacional en la predicción de susceptibilidad a enfermedades.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades más prevalentes en la historia del ser humano. En la actualidad continúa siendo un problema de salud a nivel mundial. Existe un aumento creciente de personas en el mundo que contraen tuberculosis; se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* [10], [81], infección responsable de 1.5 millones de muertes al año [4], destacando que más del 26% de estas muertes estuvieron asociadas a una infección previa con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH/SIDA) [2]. La TB en México es un problema de salud prioritario. En el 2013, se reportó un estimado de 27,000 nuevos casos con una incidencia de 23/100,000 habitantes [51].

En la actualidad se han identificado genes que son asociados como bioindicadores o factores que participan en la respuesta inmune en contra de tuberculosis y/o VIH/SIDA. Por esta razón es importante determinar si los SNPs en las regiones promotoras de estos genes, pueden generar susceptibilidad a dichas enfermedades, lo que permitiría, con estudios posteriores, generar alternativas para la prevención y tratamiento.

Utilizando las herramientas proporcionadas por proyectos internacionales como ENCODE, se tiene como objetivo prioritario, buscar alternativas para predecir y por tanto prevenir enfermedades; aunque las limitantes del conocimiento actual han hecho que esto parezca una meta difícil de alcanzar.

Por lo antes mencionado, el análisis del impacto *in vitro* de los polimorfismos de un solo nucleótido (previamente seleccionados por el software SNP Clinic) en las regiones promotoras de los genes relevantes, podría indicar susceptibilidad a tuberculosis y VIH/SIDA [7], [10], [26], [31]. Esto demostraría la funcionalidad de dichos SNPs como blancos terapéuticos. La validez de este proyecto brindaría una alternativa eficaz, en la prevención y tratamiento de dichas enfermedades.

Además de que es importante confirmar *in vitro* la funcionalidad de los SNPs en promotores de genes asociados a las enfermedades de estudio, que fueron seleccionados gracias a la utilización del software SNP Clinic desarrollado por este grupo de investigación.

## **6. HIPÓTESIS**

Existe una relación de los polimorfismos previamente seleccionados *in silico* de los genes humanos, con los niveles de expresión génica (mRNA) del gen reportero, según la variante alélica que presentan.

## 7. OBJETIVO

Evaluar la relación de los alelos polimórficos en promotor proximal de los genes humanos relevantes a tuberculosis y VIH/SIDA: *IFNG*, *IL10*, *SNX17*, *AMPH*, *CELSR2*, *PSRC1*, *HIF1A*, *HBD*, *TNFA*, *S100P*, *DEFB1* y *CAMP*, con los niveles de mRNA.

### Objetivos específicos

Someter a una evaluación *in silico* a los SNPs presentes en promotor proximal de los genes relevantes a TB y VIH/SIDA, por medio del software SNP Clinic.

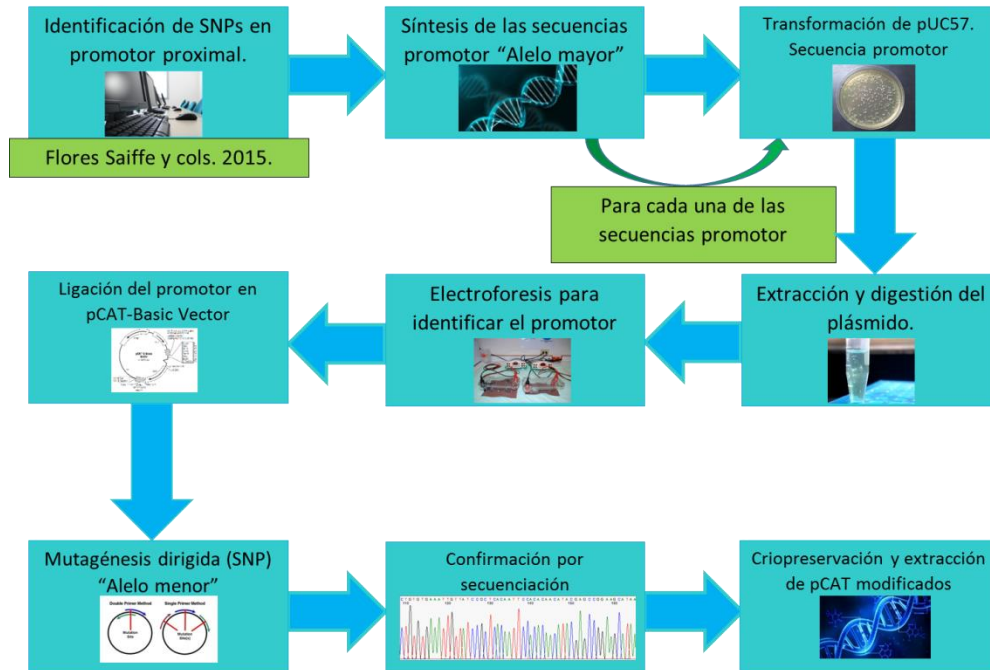
Generar las variantes que contengan los polimorfismos, con el fin de evaluar el par de alelos de cada SNP.

Mediante estudios *in vitro* en cultivo celular y expresión génica (mRNA), determinar si los SNPs seleccionados por el software SNP Clinic son funcionales.

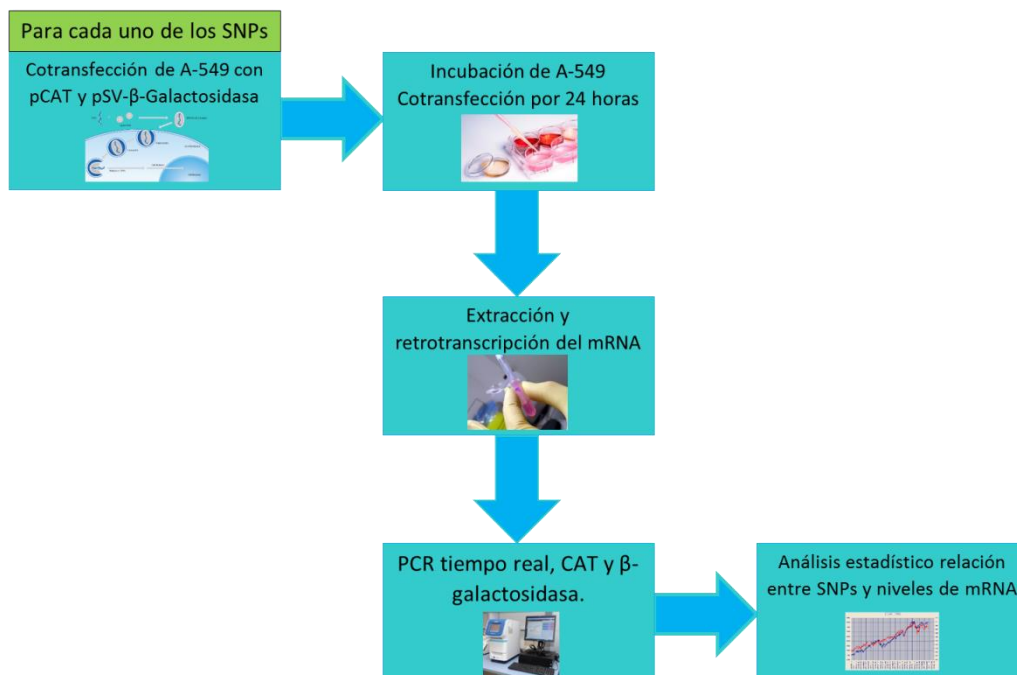
## 8. PROCEDIMIENTOS

La metodología del proyecto está dividida en dos etapas: etapa de generación de vectores de clonación y etapa del análisis *in-vitro*.

Primera etapa; generación de vectores de clonación.



Segunda etapa: análisis *in-vitro*:



## 8.1 Primera etapa; generación de vectores de clonación.

### 8.1.1 Evaluación *in silico* de los genes asociados o involucrados en respuesta inmune en contra de TB y VIH/SIDA.

La selección *in silico* de los polimorfismos putativamente funcionales fue realizada como previamente fue reportado [40]. Además, fue diseñado un promotor representativo para cada gen, este promotor contiene todos sus sitios SNPs en alelos mayores del promedio en la población mundial.

### 8.1.2. Elaboración de constructos plasmídicos y mutagénesis dirigida.

La secuencia promotor de los genes *DEFBI* y *CAMP* fue sintetizada dentro de vectores de clonación pUC57 diferentes (2710 pb) por la empresa GenScript (ver secuencias de los vectores y promotores utilizados en la sección de anexos), con sitios para enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*. Estos plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción antes mencionadas, con el fin de liberar las secuencias promotor, para posteriormente ser ligadas dentro de los sitios *XhoI* y *SacI* del vector de clonación sin promotor pCAT-Básico (vector reportero PROMEGA, 4027 pb). Todos los plásmidos fueron electroporados en células *E. coli*, para la proliferación del ADN plasmídico. La secuencia del promotor proximal (2000 pb) y el constructo resultante de la ligación del promotor y el vector pCAT-Básico (6027 pb) fueron identificados por electroforesis de ADN. Los oligonucleótidos para mutagénesis dirigida por PCR fueron diseñados básicamente de acuerdo al procedimiento del proveedor (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit; Agilent Technologies, CA). Los oligonucleótidos diseñados, listados en la tabla 1, fueron utilizados para la mutagénesis dirigida de los siguientes sitios SNPs: rs5743417, rs2738179 y rs2738182 en promotor proximal del gen *DEFBI*. Además, los sitios SNPs para rs9844566 y rs76721126 en el promotor del gen *CAMP* fueron diseñados. El total de la longitud de los oligonucleótidos varía de 27 a 35 pb. La temperatura melting (TM) fue calculada usando la formula proporcionada por el proveedor Agilent Technologies:  $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$ . La reacción de mutagénesis fue realizada en 50 µl de mix PCR que contenía 50 ng del plásmido pCAT-*DEFBI*, 5 ng del oligonucleótido #1, 5 ng del oligonucleótido #2, 1 µl de mix dNTP y 1 µl de ADN polimerasa Pfu Ultra HF (2.5 U/µl). El perfil de temperatura de PCR fue: desnaturalización inicial a 95 ° C por 30 segundos, seguida por 16 ciclos de 95°C por 30 segundos cada uno, 55°C por 1 minuto y 68°C por 6

minutos. Los productos de PCR fueron transformados dentro de células supercompetentes XL1-Blue.

Tabla 1. Oligonucleótidos para el proceso de mutagénesis dirigida.

SNP en la secuencia promotor del gen <i>DEFBI</i>	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Longitud	Mismatches
rs5743417	Mut- <i>DEFBI</i> -417-R	TAACCCCTGGT <sup>a</sup> TCATTTGCCCTGAGCAGTCAG	33	1
	Mut- <i>DEFBI</i> -417-F	CTGACTGCTCAGGGCAAATG <sup>a</sup> tACCAGGGGTTA	33	1
rs2738179	Mut- <i>DEFBI</i> -179-R	CCGTATACTCCCAC <sup>t</sup> gCAACCCTGCCAGAGA	31	1
	Mut- <i>DEFBI</i> -179-F	TCTCTGGCAGGGTT <sup>c</sup> GcAGTGGGAGTATACGG	31	1
rs2738182	Mut- <i>DEFBI</i> -182-R	GGAGGAGAGCCAC <sup>i</sup> GGGAAGCTCTGAG	27	1
	Mut- <i>DEFBI</i> -182-F	CTCAGAGCTTCCC <sup>a</sup> GTGGCTCTCCTCC	27	1
SNP en la secuencia promotor del gen <i>CAMP</i>	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Longitud	Mismatches
rs9844566	Mut- <i>CAMP</i> 566-F	GTCAGAGATGAAGAAAC <sup>g</sup> ACTTCCTCATCTGCAC	35	1
	Mut- <i>CAMP</i> 566-R	GTGCAAGATGAGGAAGT <sup>c</sup> GTTTCTTCATCTCTGAC	35	1
rs76721126	Mut- <i>CAMP</i> 126-F	GGGACAACCGGGAC <sup>a</sup> TTCATGGGAGTCTC	29	1
	Mut- <i>CAMP</i> 126-R	GAGACTCCCATGAA <sup>t</sup> GTCCCGTTGTCCC	29	1

## 8.2 Segunda etapa: análisis *in-vitro*.

### 8.2.1 Cultivo celular y transfección.

La línea celular A549 (carcinoma de pulmón de *Homo sapiens*) fue mantenida en medio de cultivo DMEM/F12 Gibco a 37°C, en una incubadora para cultivo celular con 5% de CO<sub>2</sub>. 24 horas previas a la transfección, las células de A549 fueron transferidas a placas de 6 pocillos a una densidad de 5\*10<sup>5</sup> células/pocillo. 20 minutos antes del proceso, el mix de transfección fue preparado con las siguientes cantidades: 0.6 µg de vector control pSV-β-galactosidasa (vector control Promega), 0.6 µg de vector de estudio (pCAT-*DEFBI* y sus correspondientes SNPs), y 3.6 µL de agente transfectante (TransFas Transfection Reagent, Promega) en medio DMEM libre de suero fetal bovino. Enseguida, el medio fue removido y las células de cada

pocillo fueron cuidadosamente lavadas con 500 µL de búfer-fosfato salino (PBS); entonces, 500 µL de mix de transfección fueron agregados a cada pocillo. Después, las placas fueron incubadas por 4 horas. Enseguida, 1500 µL de medio con suero fetal bovino fueron agregados a cada pocillo para lograr una concentración final de suero del 10%, y las placas fueron incubadas por 24 horas. La co-transfección con pSVβ-gal (Promega) permite la normalización en la eficiencia de transfección.

### 8.2.2 PCR en tiempo real.

Los ácidos nucleicos fueron extraídos con el kit de aislamiento MagMAX-96 Total RNA. El ARN purificado fue tratado con DNAsas para posteriormente ser sometido a un proceso de retrotranscripción con un mix que contiene: oligonucleótidos random (Invitrogen) y enzima ArrayScript (Applied Biosystems). La PCR tiempo real fue realizada con 40 ng de ADN complementario y master mix Fast SYBR Green (Applied Biosystems). Las cantidades para cada reacción en la PCR tiempo real fueron las siguientes: para el gen de cloranfenicol acetiltransferasa: 6 µL de mix, 33.815 nanogramos de primers forward y reverse, 3 µL de cDNA; para el gen beta galactosidasa: 5.6 µL de mix, 43.043 nanogramos de primers forward y reverse, 3 µL de cDNA. El volumen total para cada reacción fue de 10 µL por pozo en la placa para PCR tiempo real. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador Step One (Applied Biosystems) usando las siguientes secuencias de oligonucleótidos diseñados con Primer Express v. 3.0 software (Applied Biosystems) y evaluada su especificidad en PRIMERBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabla 2. Oligonucleótidos para PCR tiempo real.

Gen	Oligonucleótidos para PCR tiempo real	Secuencia
<i>HPRT</i>	<b>Forward</b>	5'TGTTCAAATTATTACCAGTGAATCTTTGTC-3'
	<b>Reverse</b>	5' TTTTAAATTTTTGGGAATTTATTGATTG-3'
β-Galactosidasa ( <i>lacZ</i> )	<b>Forward</b>	5' TGACGGAAGCAAAACACCAG-3'
	<b>Reverse</b>	5' CTATGACGGAACAGGTATTTCGCT-3'
Cloramfenicol acetiltransferasa ( <i>cat</i> )	<b>Forward</b>	5' TCTGGAGTGAATACCACGACGA-3'
	<b>Reverse</b>	5' AGGGATTGGCTGAGACGAAAA-3'



El ciclo de temperaturas para la PCR tiempo real fue la siguiente: 95°C por 20 segundos, 40 ciclos a 95°C por 3 segundos y 60°C por 30 segundos. Las curvas melting fueron realizadas a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y 95°C por 15 segundos. Las eficiencias de amplificación para cada gen fueron calculadas y la expresión relativa cuantitativa fue obtenida de acuerdo al método Pfaffl [82]. La normalización de la expresión génica incluye a los valores de entrada de ARN, ADN complementario y normalización de la eficiencia de transfección de pSV $\beta$ -gal.

### 8.2.3 Análisis estadístico.

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en Microsoft Excel 2010. Para evaluar si las varianzas eran diferentes o iguales entre los tratamientos, nosotros realizamos pruebas F. Dependiendo de los resultados obtenidos de las pruebas F, pruebas *t*- Student para varianzas iguales o desiguales fueron realizadas. Los resultados fueron mostrados como la media más el error estándar de la media. Los experimentos fueron realizados al menos por triplicado y un valor *P*-value <0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Predicción *in silico* de SNPs regulatorios putativamente funcionales.

Primeramente, obtuvimos los SNPs probables en promotor proximal de cada uno de los genes de estudio que podrían tener un impacto en la expresión genética. Los resultados fueron resumidos en la tabla 3. Esto fue posible gracias a la aplicación del método SNP Clinic. El análisis *in silico* no arrojó resultados positivos para los genes: *IFNG*, *AMPH*, *HBD*, *IL10*, *TNFA* y *HIF1A*.

Tabla 3. SNPs en promotor proximal de los genes de estudio que podrían tener un impacto significativo en la expresión génica. El método SNP Clinic utiliza cinco bases de datos de acceso de cromatina: Open chromatin by DNaseI HS (Duke DNaseI HS), Open chromatin by FAIRE (UNC FAIRE), DNaseI Digital Genomic Footprinting (UW DNaseI DGF), DNaseI Hypersensitivity by Digital DNaseI (UW DNaseI HS), DNaseI Hypersensitivity Uniform Peaks (DNaseI HUP). Todas estas bases de datos de acceso de cromatina provienen de ENCODE.

Tabla 3. Listado de SNPs con mayor probabilidad de alterar la expresión génica.

Gen	SNP	Base de datos para acceso de cromatina	Línea celular	Origen
<i>CAMP</i>	rs76721126	UW DNaseI HS	CD20	Linfocito B
			GM13976	Linfoblastoide
	rs9844566	Todas	A549	Carcinoma de pulmón
<i>SNX17</i>	rs7602534	UW DNaseI HS	A549	Carcinoma de pulmón
			GM12878	Linfocito B
	rs76522591	Todas	A549	Carcinoma de pulmón
<i>DEFB1</i>	rs2738179	UNC FAIRE	NHBE	Epitelio bronquial/traqueal
	rs5743417	UW DNaseI DGF	A549	Carcinoma de pulmón
	rs2738182	Todas	A549	Carcinoma de pulmón
<i>CELSR2</i>	rs664428	Todas	A549	Carcinoma de pulmón
<i>PSRC1</i>	rs6669669	UW DNaseI DGF	A549	Carcinoma de pulmón
<i>S100P</i>	rs59799218	Todas	A549	Carcinoma de pulmón

## 9.2 Construcción de plásmidos y mutagénesis dirigida.

### 9.2.1 Promotor proximal del gen *CAMP*.

El promotor proximal del gen *CAMP* fue purificado y se realizó el proceso de ligación. El producto de esta metodología fue identificado por electroforesis en gel de agarosa para ADN. Sin embargo, no se obtuvo una ligación exitosa entre el promotor del gen *CAMP* y el vector pCAT-Básico. (Ver figura 8 y 9).

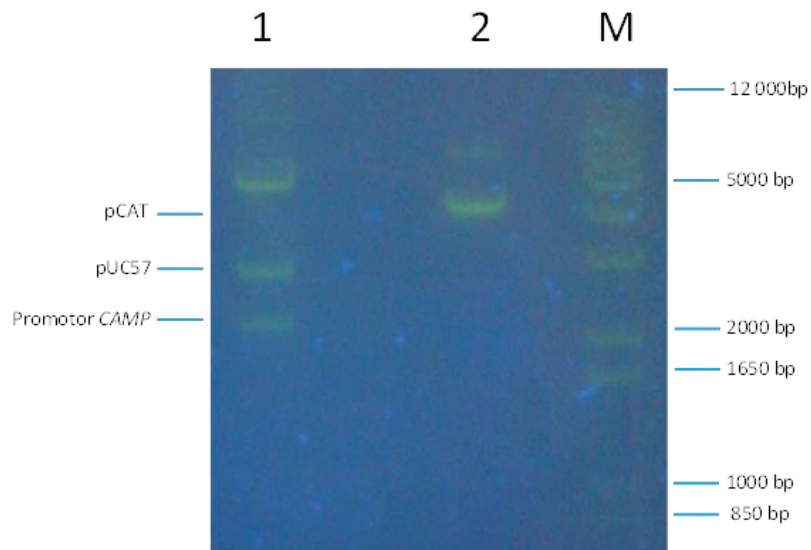


Figura 8. Identificación de la secuencia del promotor proximal del gen *CAMP* después de la digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*. Línea 1: vector pUC57 con el promotor (tamaños esperados: 2710 pb para el vector pUC57 y 2000 pb para el promotor). Línea 2: vector pCAT-Básico (tamaño esperado: 4027 pb). (M=100 bp-12,000 bp, 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

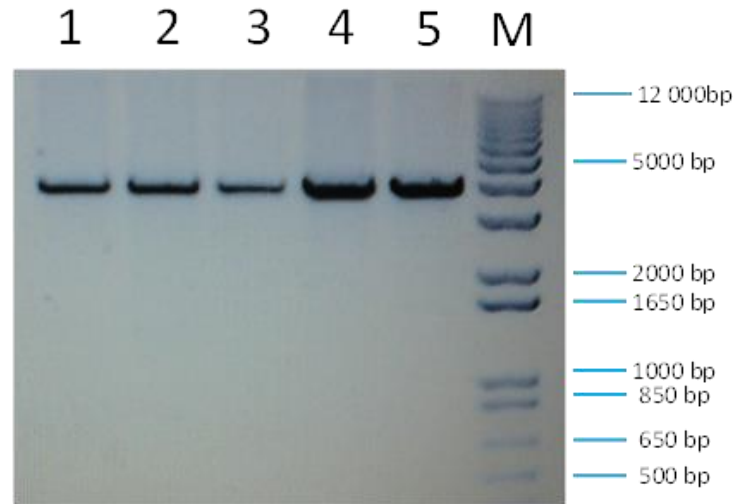


Figura 9. Identificación de la ligación del vector pCAT-Básico con el promotor proximal del gen *CAMP*. Línea 1, 2, 3 y 4: Diferentes productos de ligación pCAT-*CAMP* (tamaño esperado: 6027 pb). Línea 5: vector pCAT-Básico (tamaño esperado: 4027 pb). (M=100 bp-12,000 bp, 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

#### 9.2.2 Promotor proximal del gen *DEFB1*.

Digerimos el vector pUC57 que tiene el promotor proximal del gen *DEFB1* con las enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*. La banda de ADN correspondiente al promotor fue purificada y ligada al vector al vector pCAT-básico. El producto de esta ligación fue identificado por electroforesis en gel de agarosa para ADN. (Ver figura 10 y 11).

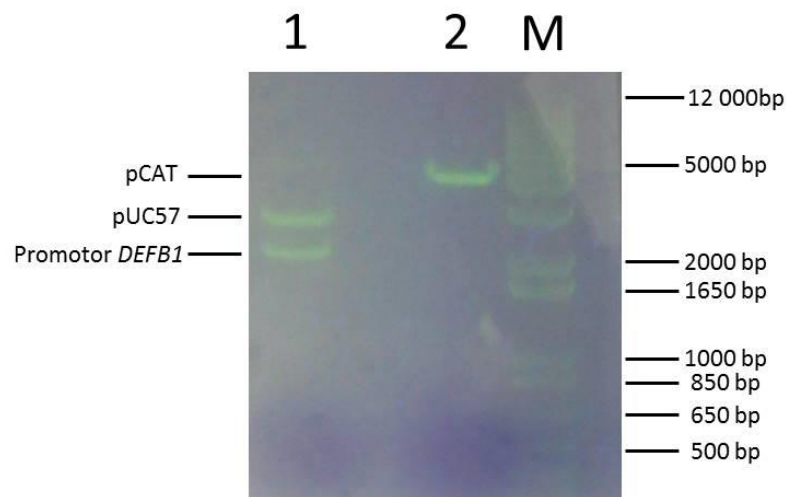


Figura 10. Identificación de la secuencia del promotor proximal del gen *DEFB1* después de la digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*. Línea 1: vector pUC57 con el promotor (tamaños esperados: 2710 pb para el vector pUC57 y 2000 pb para el promotor). Línea 2: vector pCAT-Básico (tamaño esperado: 4027 pb). (M=100 bp-12,000 bp, 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

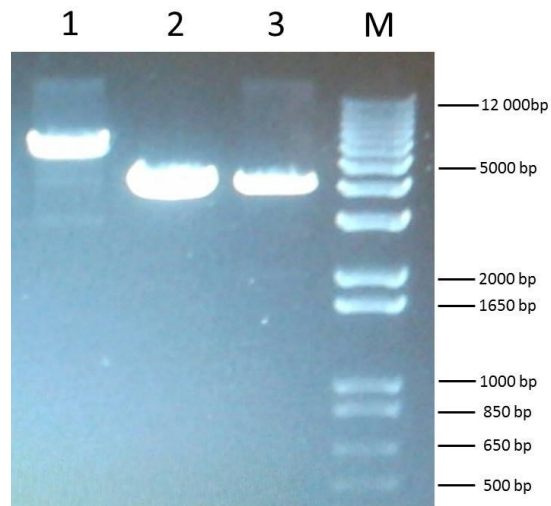


Figura 11. Confirmación de la ligación del vector pCAT-Básico con el promotor proximal del gen *DEFB1*. Línea 1: producto de la ligación pCAT-*DEFB1* (tamaño esperado: 6027 pb). Línea 2 y 3: vector pCAT-Básico (tamaño esperado: 4027 pb). (M=100 bp-12,000 bp, 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

Al momento en el que fue concluido con éxito el proceso de ligación, continuamos con la metodología de mutagénesis dirigida con el fin de generar los promotores proximales del gen *DEFB1* que contienen los SNPs seleccionados e identificados previamente. Generamos tres vectores pCAT-*DEFB1*, que contenían un SNP en cada uno de ellos: rs5743417 (pCAT-*DEFB1*-417), rs2738179 (pCAT-*DEFB1*-179) y rs2738182 (pCAT-*DEFB1*-182). Estos plásmidos modificados fueron transformados dentro de células supercompetentes XL1-Blue y el tamaño del ADN fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa para ADN. (Ver figura 12).

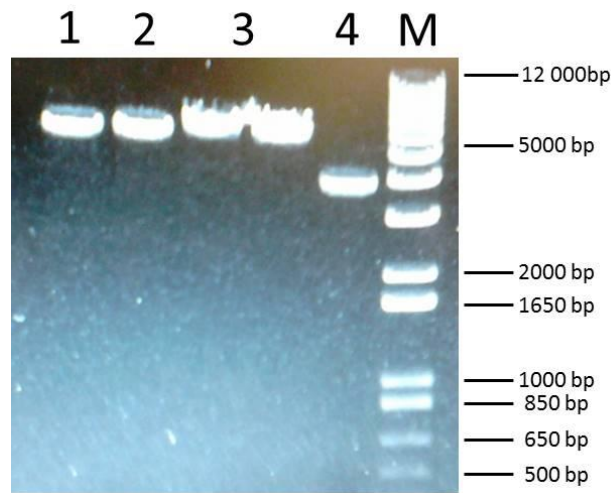


Figura 12. Confirmación de productos mutagénicos. Línea 1: pCAT-DEFBI-182, línea 2: pCAT-DEFBI-179 y línea 3: pCAT-DEFBI-417 (tamaño esperado para los productos del proceso mutagénico: 6027 pb). Línea 4: vector pCAT-Básico (tamaño esperado: 4027 pb). (M=100 bp-12,000 bp, 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

Cabe mencionar que los productos obtenidos después de la metodología de mutagénesis dirigida fueron sometidos a un proceso de secuenciación, con el fin de asegurar que el cambio de base correspondiente a los SNPs de estudio, estuviera presente en el material genético que sería utilizado en análisis posteriores.

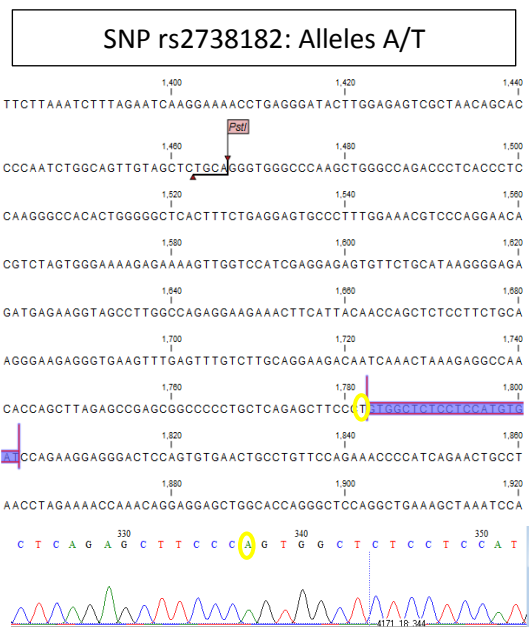
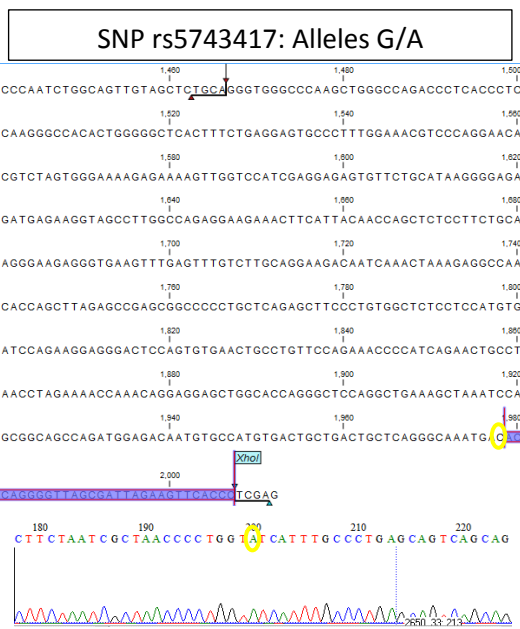


Figura 13. Confirmación del cambio de par de base de los productos obtenidos de la mutagénesis dirigida. Cada posición de SNP está indicada con un círculo amarillo en la secuencia del promotor proximal del gen *DEFB1* y en el cromatograma. El cambio de par de base para los SNPs rs5743417 y rs2738182 fue exitosa. Sin embargo, el cambio de par de base para el SNP rs2738179 no fue satisfactorio.

### 9.3 Transfecciones y PCR tiempo real.

Células A549 fueron co-transfectadas transitoriamente con los diferentes plásmidos mutagénicos y con el vector pSV $\beta$ -gal. Después de 24 horas, los ácidos nucleicos fueron extraídos de dichas células, el ARN purificado fue tratado con DNAsas y sometido a un proceso de retrotranscripción. La PCR tiempo real fue realizada con los productos finales de dicho proceso. Los resultados son mostrados en la figura 14. El SNP rs2738182 no mostró un impacto significativo en la expresión génica del gen reportero *cat* (cloramfenicol acetiltransferasa). Sin embargo, el SNP rs5743417 tuvo un impacto significativo en la expresión génica; este SNP disminuyó la expresión del gen reportero *cat* significativamente (-32.64% de disminución con un p-value de 0.0298).

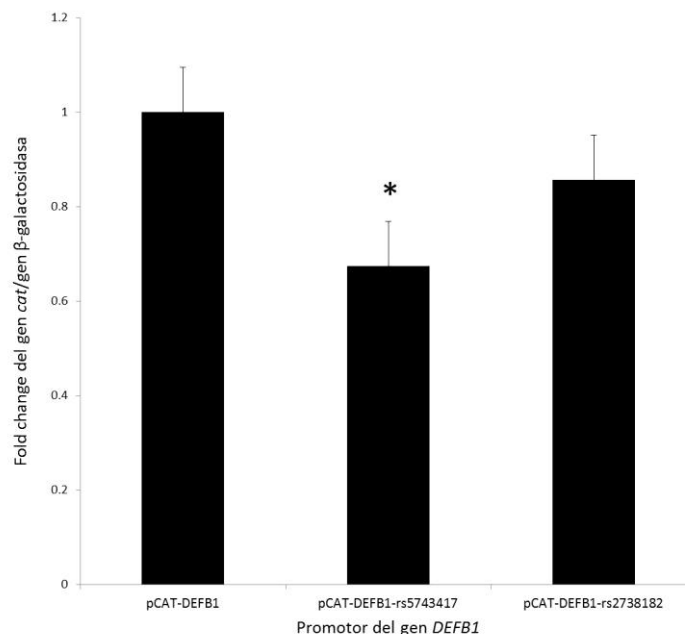


Figura 14. Expresión genética relativa en la línea celular A549 transfectada con los diferentes promotores del gen *DEFB1*. El grupo de referencia fue pCAT-*DEFB1* y los valores significativos de las pruebas *t*- Student son representados como  $*=P < 0.05$ .

Nosotros identificamos algunos SNPs en genes asociados como biomarcadores o en respuesta inmune en contra de TB y VIH/SIDA. Uno de los genes seleccionados es *DEFB1*, que codifica para  $\beta$ -defensina humana 1. Esta molécula es uno de los péptidos antimicrobianos más importantes, por su destacada participación en los diferentes procesos celulares de tejidos epiteliales.  $\beta$ -defensina humana 1 es un elemento importante en las funciones antimicrobiales. Dentro de estas funciones se encuentran: inmuno regulación, metabolismo de la glucosa, diferenciación celular, entre otras. Además,  $\beta$ -defensina humana 1 ha sido propuesta como un supresor tumoral [83]. Se sabe además que esta molécula desempeña una función de defensa en procesos ausentes de inflamación en epitelios del aparato respiratorio en humanos [84]. También se han identificado polimorfismos en el gen *DEFB1* que modulan el riesgo a la infección y progresión de VIH/SIDA en población mexicana [31]. El estudio de los SNPs con potencial de influir un cambio en la expresión genética del gen *DEFB1* podría representar un importante punto a considerar en cuestiones como susceptibilidad a enfermedades infecciosas específicas como lo son la TB y su asociación con VIH/SIDA. Nosotros evaluamos a nivel in vitro, SNPs en promotor proximal del gen *DEFB1* que podrían modificar su expresión.

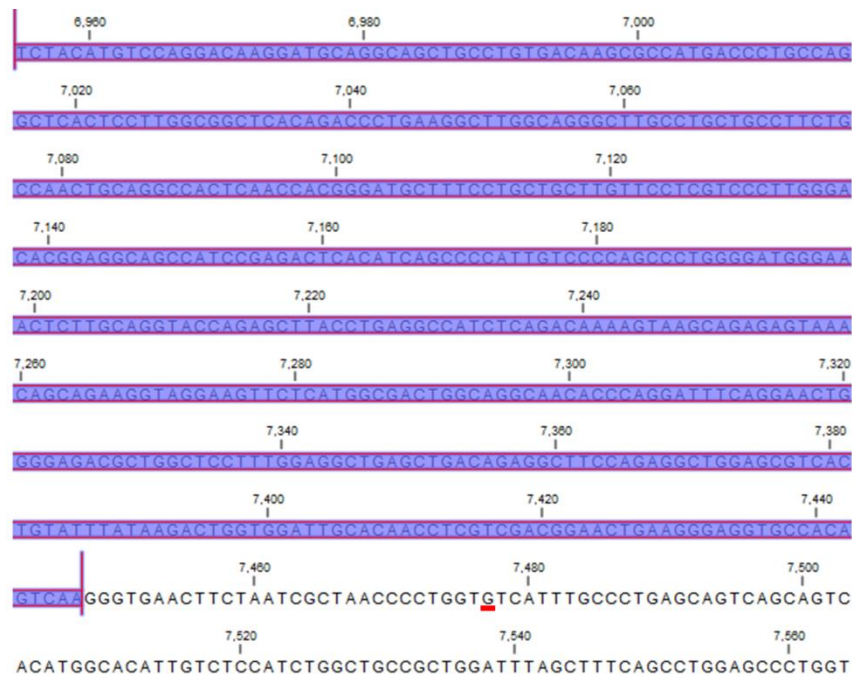


Figura 15. Posición del SNP rs5743417 en promotor proximal del gen *DEFB1*. La secuencia que está marcada con color púrpura corresponde al inicio del gen *DEFB1*. El nucleótido que está marcado con una línea roja corresponde al SNP rs5743417.



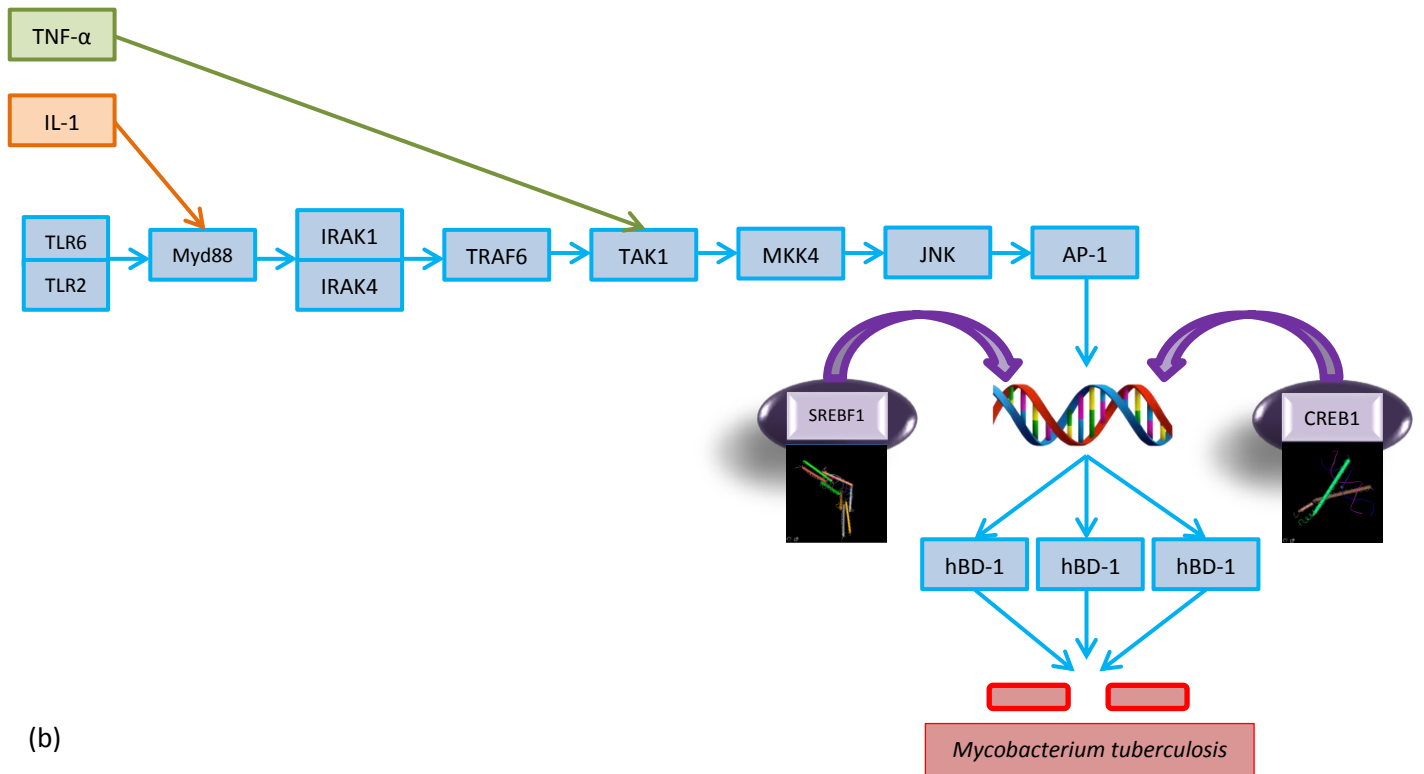
El SNP rs5743417 disminuyó la expresión del gen reportero *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa) significativamente (-32.64% de disminución). Por lo tanto, proponemos que el SNP rs5743417 en el promotor proximal del gen *DEFB1* podría disminuir su expresión en individuos con este polimorfismo. Esto podría representar susceptibilidad a tuberculosis, al virus de inmunodeficiencia humana o a la asociación de ambas enfermedades. Esto es debido a que el decremento del péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina humana 1 podría tener un efecto importante en la respuesta inmune del individuo que presenta este polimorfismo, como ha sido reportado en otras investigaciones, en donde la baja expresión del gen *DEFB1* podría representar una susceptibilidad considerable a enfermedades infecciosas en diferentes tejidos epiteliales [85].

CCAACTGCASGCCRCTCAACCRSGGKATGCTTTCCTRCTRCTTGTTCCCTRTCCTTGGG  
 AAYGGAGGCAGCCAKCYGARACTCACATCAGCCCCATTKTCCCMAGCCCTGKKRAYGGR  
 AAAHSTWGCAGSTRSYAKMRYTTASVTGAGGYCATCTSAGASAAAAGTAARYAGSASK  
 AAACAGCRGAAVTIARGAARTTCTYATRGYNACTRRCMGGCAAYACCCASKATTTCMGG  
RCTGRGGAGACVCTGGCTCCTTTGGAGGCTGAGCTGACAGAGGCTTCMAGAGGCTGGAGC  
 GTCACTGTATTTATAAGACTGGTGGATTGCACAVYCTCRTYRAYRGAACTGAARGGAGGY  
 GCCACAGTCAAGGGTGAACTTCTAATCRSTAACCCCTGGTRTCATTTGCCCTGAGYAGTC  
 AGCAGTCAATGGCAVATTGTCTCCATCTGGCTGCYRCTGGATTTAGYTTTTTCAGCCTGGA  
 GCCCTGGTGCCAGCTCCTCCTRTTTGGTTTTCTARGTTAGGCAGTTCTGATGGGRTTTCT  
 GGAACAGGCAGTYACACTGGAGTCCCTCCTTCTGGRTCACATGGAGGAGAGCCAYWGGG  
 AAGCTCTGAGCAGGGGCCRCTSRSCTCTAAGCTGGTGTGRCTCTTTAGTTTGATTGT  
 CTTMCTGCAAGACARACTCAASTTTACCYTCTTCCCTTGCAGARGGAGAGCTGGTTGTA  
 ATGAAGTTTCTTCTCTGGCCAAGGCTACCTTCTCATSTCTCYCCTTAKGCAGAACACTC  
 TYCTCGATGGACCRCTTYTC

Figura 16. Otros polimorfismos no funcionales excluidos con nuestro método *in silico* en el entorno genómico lineal de rs5743417 (subrayado y resaltado en rojo). De acuerdo al código nucleotídico de la IUPAC: transición R (puRine)= A/G; transversión S (Strong)= C/G; transversión W (Weak)= A/T; transición Y (pYrimidine)= C/T; V: A/C/G (no T); K= G/T (Keto); M=A/C (aMino); H=A/C/T (no G), N=A/C/G/T (aNy).

EVALUACIÓN IN VITRO DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA

(a)



(b)

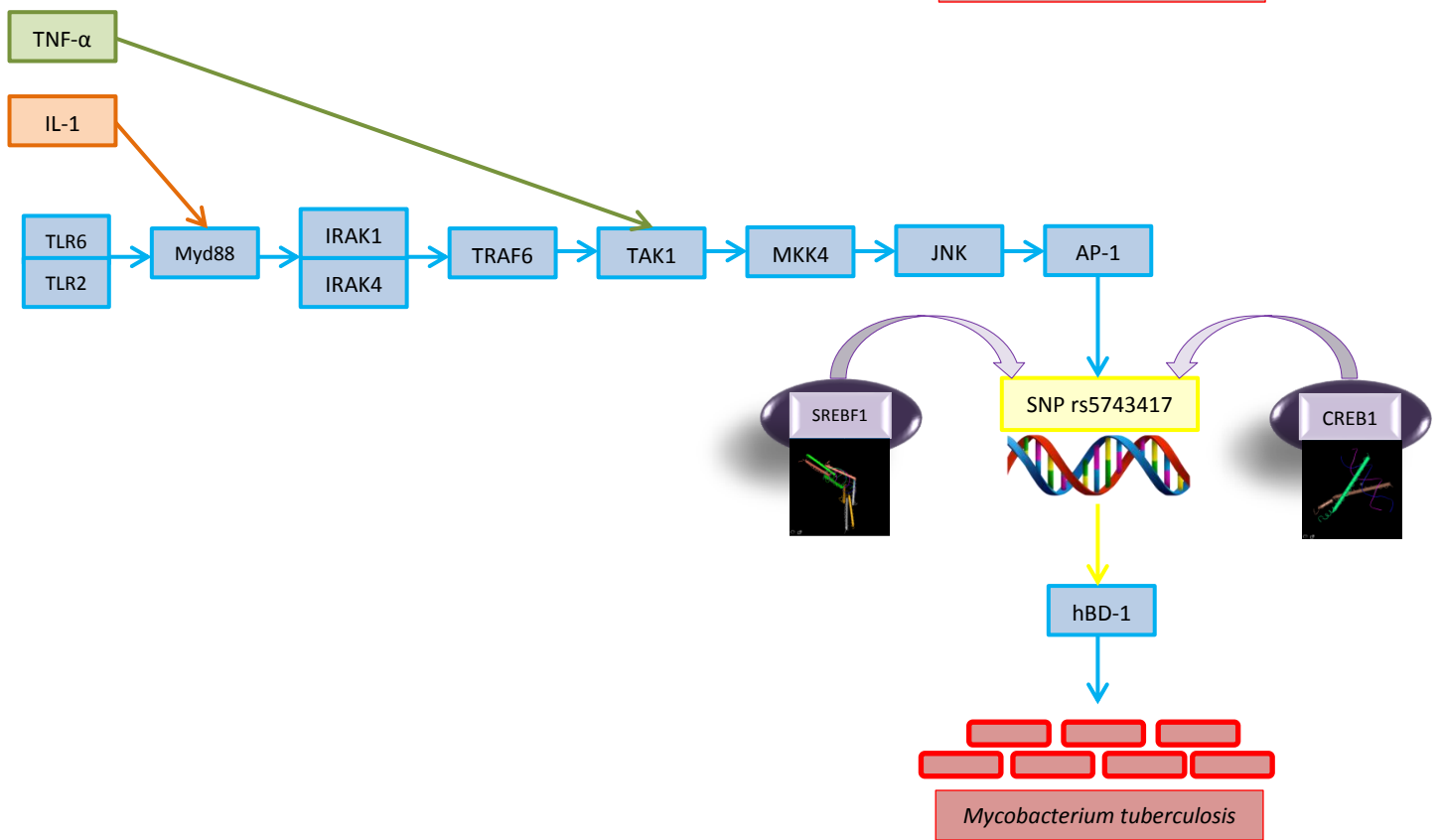


Figura 17. Alteración de la expresión genética que es posiblemente causada por la presencia del SNP rs5743417. (a) Cuando la secuencia promotora presenta los alelos mayores, los factores de transcripción SREBF1 y CREB1, pueden interactuar adecuadamente con la secuencia de reconocimiento del promotor; esto permite la expresión suficiente del péptido  $\beta$ -defensina humana 1 que podría disminuir el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis*. (b) cuando el promotor presenta el alelo menor (SNP rs5743417), los factores de transcripción SREBF1 y CREB1 no pueden interactuar adecuadamente con el sitio de reconocimiento del promotor, esto puede ocasionar la alteración en la expresión del gen *DEFB1* que, a su vez, podría disminuir la cantidad del péptido  $\beta$ -defensina humana 1; por lo tanto, *Mycobacterium tuberculosis* puede desarrollarse adecuadamente en ausencia de una respuesta inmune innata efectiva.

Existen algunas poblaciones específicas que podrían ser afectadas por este polimorfismo; por lo tanto, estas poblaciones podrían ser susceptibles a una infección de TB y VIH/SIDA. La población puertorriqueña presenta el polimorfismo rs5743417 en 1% de su población total, mientras que en la población africana, este polimorfismo está presente en el 4% de su población total. Por lo tanto, este hecho podría representar una susceptibilidad a TB y VIH dentro de estas poblaciones.

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417)). El polimorfismo rs2738182 no tiene un impacto significativo en la expresión genética del gen reportero. Los resultados de la evaluación *in silico* mostraron que el SNP rs5743417 podría ser considerado como el SNP con mayor probabilidad de inducir un cambio en la expresión génica, seguido por el SNPs rs2738182. Esto es tomando en consideración el valor RBS (relative binding scores) para los alelos mayores y menores de los alelos de cada SNP como es representado en el método del SNP Clinic [40]. Nosotros comparamos los resultados obtenidos a partir de la evaluación *in silico* (SNP Clinic) con los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro*, esto mostró que el SNP rs5743417 disminuyó la expresión del gen reportero como nosotros esperábamos. Sin embargo, El SNP rs2738182 no tiene un impacto significativo en la expresión génica del gen reportero que era esperado. Esto podría ser explicado con la consideración del valor de redundancia homotípica de cada SNP, esto debido a que nosotros asumimos que mientras existan más sitios de unión a factor de transcripción (TFBS) para un factor de transcripción (TF), el SNP de estudio representaría un

impacto menor en la expresión genética. El SNP rs5743417 altera la secuencia del gen miRNA ENSG00000245857, además de que afecta a factores de transcripción que tienen solo un TFBS (los factores de transcripción CREB1 y SREBF1), mientras que el SNP rs2738182 impacta en TFs que tienen más de un TFBS (Factores de transcripción como: ZEB1 MAX, USF2, SPIB y TFAP2C). Por lo tanto, aunque el SNPs rs2738182 pueda afectar en un sitio de unión a factor de transcripción, este TFBS puede ser sustituido por otro, por lo tanto, esto reduciría el impacto de los SNPs en la expresión génica.

Nosotros intentamos conseguir resultados con respecto a los SNPs en promotor proximal del gen *CAMP* y su impacto en la expresión génica. Sin embargo, no fue posible conseguir una ligación exitosa entre el promotor del gen *CAMP* y el vector pCAT-Básico. Primero que nada, la cantidad de ADN del vector pUC57 que contenía la secuencia promotor del gen *CAMP*, en ningún momento logró obtenerse en una cantidad considerable, lo que pudo representar un impedimento para la obtención de un producto de ligación exitoso. Después de la transformación dentro de *E. coli* por electroporación de los productos obtenidos después de los procesos de ligación del promotor del gen *CAMP* con el vector pCAT-Básico, no se logró obtener ningún resultado positivo. Esto pudo ser ocasionado por dos razones principales: la secuencia del promotor proximal del gen *CAMP* tiene un número considerable de secuencias repetidas de ADN y además, tiene un número considerable de secuencias invertidas de ADN. Esto podría tener un impacto significativo en la cantidad del plásmido pUC57-*CAMP* obtenido después de su electroporación en células electrocompetentes de *E. coli*. El ADN que contiene secuencias repetidas induce la degradación del plásmido en células *E. coli*, esto es debido a que cuando la secuencia es transformada dentro de estas células, ocurre un proceso de recombinación entre estas secuencias repetidas, causando pérdidas de secuencias nucleotídicas, lo que al final ocasiona que el ADN sea degradado por la célula [86]. La otra posible explicación ocurre cuando el ADN insertado contiene secuencias invertidas de ADN (palíndromos o palíndromos interrumpidos). Quizá esto se debe a que estas secuencias tienen una influencia perjudicial en el estado de superenrollamiento del plásmido, dejando abierta la posibilidad de una degradación por nucleasas por parte de la célula de *E. coli* [87].

El primer análisis *in silico* de los SNPs en promotor proximal de los genes de estudio fue realizado con una versión beta del software SNP Clinic. Sin embargo, este software continúa

en desarrollo para mejorar la predicción de SNPs relevantes que podrían influir una alteración en la expresión de genes importantes que están relacionados a enfermedades específicas. Un segundo análisis fue realizado con una versión 1 del software SNP Clinic.

Tabla 4. Resultados del análisis con la versión 1 del software SNP Clinic. Genes referentes a TB y VIH/SIDA, en las líneas celulares A549, T<sub>H</sub>1 y HL60.

Gen	rSNPs putativos	Líneas celulares con SNPs positivos	Base de datos para accesibilidad de cromatina
<i>DEFB1</i>	2	A549, HL60	DNaseI HUP
<i>CAMP</i>	1	HL60	DNaseI HUP
<i>CELSR2</i>	1	T <sub>H</sub> 1	DNaseI HUP
<i>HIF1A</i>	1	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	DNaseI HUP
<i>PSRC1</i>	1	A549, T <sub>H</sub> 1	DNaseI HUP
<i>SNX17</i>	1	T <sub>H</sub> 1	DNaseI HUP
<i>AMPH</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>HBD</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>IFNG</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>IL10</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>S100P</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>TNFA</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-

En este análisis, los resultados sugirieron que los genes *DEFB1*, *CAMP*, *CELSR2*, *HIF1A*, *PSRC1* y *SNX17*, tienen SNPs que podrían alterar la expresión génica. Sin embargo, los genes *AMPH*, *HBD*, *IFNG*, *IL10*, *S100P* y *TNFA*, no mostraron ningún resultado positivo referente a SNPs que pudieran impactar la expresión génica, esto en las líneas celulares A549, T<sub>H</sub>1 y HL60. Estos resultados difieren a los resultados obtenidos en el análisis con la versión beta del software SNP Clinic, en donde SNPs de los genes *CAMP*, *SNX17*, *DEFB1*, *CELSR2*, *PSRC1* y *S100P*, podrían alterar la expresión génica en la línea celular A549, mientras que en los resultados del análisis con la versión 1 del software SNP Clinic mostraron que solo los genes *DEFB1*, *HIF1A* y *PSRC1*, tienen SNPs que podrían alterar la expresión génica en la línea A549.

Esto reafirma la importancia de la mejora continua del software SNP Clinic, con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad en la selección de SNPs, que garantice que estas variaciones podrán ocasionar una alteración real de la expresión génica. Cabe mencionar que

en los dos resultados, tanto en el realizado con la versión beta como en la versión 1 del SNPclinic, el SNP rs5743417 del gen *DEFB1*, resultó ser el SNP con mayor probabilidad de alterar la expresión génica en la línea celular A549, lo cual fue corroborado a nivel *in vitro* en este proyecto.

Tabla 5. Comparación de los resultados obtenidos de la versión beta y 1 del software SNP Clinic, considerando; la línea celular A549 y la actualización GRCh37.

Análisis con la versión beta del software SNP Clinic		Análisis con la versión 1.0 del software SNP Clinic	
Gen	No. de rSNPs	Gen	SNP
<i>CAMP</i>	2	<i>CAMP</i>	Ninguno
<i>SNX17</i>	2	<i>SNX17</i>	Ninguno
<i>DEFB1</i>	3	<i>DEFB1</i>	1
<i>CELSR2</i>	1	<i>CELSR2</i>	Ninguno
<i>PSRC1</i>	1	<i>PSRC1</i>	1
<i>S100P</i>	1	<i>S100P</i>	Ninguno
<i>HIF1A</i>	Ninguno	<i>HIF1A</i>	1

Esto además, pone de manifiesto la importancia de la selección de los parámetros de entrada para el análisis, ya que los rasgos como lo es el tipo de línea celular, influyen en gran medida en los resultados obtenidos por el software SNP Clinic. Esto debido a que las diferencias entre la maquinaria de expresión genética en cada una de las líneas celulares de un organismo, influye considerablemente en la selección de SNPs que podrían impactar la expresión de un gen específico.

Los análisis en los promotores de genes asociados a TB y VIH/SIDA realizados en las versiones beta y 1 del SNP Clinic, fueron realizados con información referente a bases de datos complementadas con la actualización GRCh37, y además, enfocadas a población mundial, por lo que es importante destacar que la población a la que es enfocado este tipo de análisis, influye en gran medida con los resultados obtenidos. Por consiguiente, se decidió realizar un posterior análisis de estos genes asociados a TB y VIH/SIDA, con la diferencia de solo considerar los datos referentes a población mexicana en Los Ángeles, California, estos datos son obtenidos en la plataforma en línea Ensembl. Además, con el fin de actualizar los datos de entrada, se decidió utilizar la última versión de los datos, la cual corresponde a la actualización GRCh38.p5.

Tabla 6. Resultados del análisis con la versión 1 del software SNPclinic, basados en un grupo mexicano en Los Ángeles, California. Genes referentes a TB y VIH/SIDA, en las líneas celulares A549, T<sub>H</sub>1 y HL60.

<b>Gen</b>	<b>rSNPs</b>	<b>Línea celular</b>	<b>Base de datos para acceso de cromatina</b>
<i>DEFB1</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>CAMP</i>	1	T <sub>H</sub> 1	DNaseI HUP
<i>CELSR2</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>HIF1A</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>PSRC1</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>SNX17</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>AMPH</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>HBD</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>IFNG</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>IL10</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-
<i>S100P</i>	2	HL60, T <sub>H</sub> 1	DNaseI HUP
<i>TNFA</i>	Ninguno	A549, T <sub>H</sub> 1, HL60	-

Como se puede apreciar, los resultados varían en gran medida dependiendo la población a la que fue enfocado el análisis. Esto resalta la importancia de las variaciones genéticas presentes en las diversas poblaciones, con respecto a su posible participación en la alteración de la expresión de genes relevantes en la respuesta inmune en contra de enfermedades específicas, ya que diversas poblaciones presentan diferentes SNPs en su secuencia genética que podrían alterar la expresión de ciertos genes, que para otra población serían expresados de manera adecuada.

## 10. DISCUSIÓN

Como es descrito en los resultados, el SNP rs5743417 afecta la interacción entre los factores de transcripción SREBF1 y CREB1, con el promotor del gen *DEFB1*. Esto fue gracias a la utilización del software SNPclinic y posteriormente fue confirmada la influencia de este SNP en la expresión del gen en un modelo con la línea celular A549 a nivel *in vitro*. Ahora bien el factor de transcripción SREBF1 es una proteína que se une a la secuencia promotor de diferentes genes 5'-ATCACCCCAC-3'. Se sabe que durante el proceso de transcripción esta molécula se une a la membrana nuclear, permitiendo la interacción con los promotores de los genes. Este factor de transcripción se ha estudiado ampliamente en la biosíntesis de esterol y se conoce que esta molécula tiene un rol importante en la regulación de los esteroides, lo cual es crucial en órganos como el cerebro [88]. Ahora bien, si este factor de transcripción tiene un papel importante en la producción de hBD-1 y el SNP rs5743417 altera la interacción entre este factor y la secuencia promotor del gene *DEFB1*, no importara si la producción de SREBF1 o su correcto acomodo en la membrana nuclear es el adecuado, ya que al final, si su interacción con el promotor se ve alterada, esto impactara directamente en la expresión del gen, lo que ocasionaría una disminución en un elemento de respuesta inmune importante en la resistencia en contra de Tuberculosis y VIH/SIDA. El otro factor de transcripción que está implicado en la interacción con el promotor del gen *DEFB1* es CREB1. Esta proteína pertenece al conjunto de factores de transcripción CREB, los cuales son miembros a su vez de la familia de proteínas de unión a ADN con cremallera de leucina. Se conoce que esta molécula tiene un papel importante en el reclutamiento de otros factores necesarios para la polimerización de RNA, lo cual tiene efectos cruciales en la proliferación, diferenciación y sobrevivencia en células neuronales y hematopoyéticas [89], [90]. Por lo tanto, si este factor de transcripción está involucrado en la correcta expresión del gen *DEFB1*, la presencia del SNP rs5743417 en el promotor altera su interacción con el este factor, lo que ocasiona alteraciones en el reclutamiento de otros factores necesarios para la polimerización del RNA. Esto a su vez, podría representar una debilidad en la respuesta inmune efectiva en contra de TB y VIH/SIDA, ya que esto implicaría una disminución del péptido antimicrobiano hBD-1.

Ahora bien, el SNP rs5743417 disminuyo la expresión del gen reportero *cat* (cloramfenicol acetiltransferasa) significativamente en un -32.64% de disminución con un p-value de 0.0298.



Por esta razón proponemos que el SNP rs5743417 disminuye la expresión del gen *DEFB1* en individuos con este polimorfismo, lo que podría representar un factor de susceptibilidad a TB y VIH/SIDA. El SNP rs5743417 se encuentra presente en el 1% de la población mundial, destacando su presencia en poblaciones, puertorriqueña y principalmente en población africana.

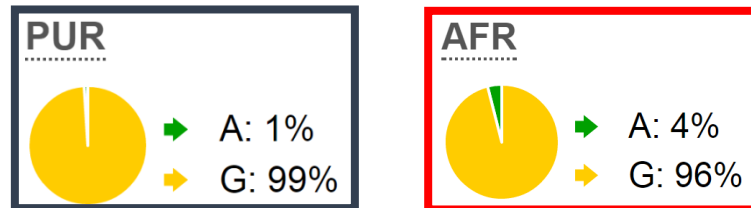


Figura 18. Porcentajes de las poblaciones en donde el SNP rs5743417 se encuentra presente. PUR: población puertorriqueña, AFR: población Africana. (ENSEMBL, [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=variation;vf=3112547](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=variation;vf=3112547)).

El SNP rs5743417 está presente en un porcentaje alto en población africana, destacando entre este grupo de personas, a las poblaciones de africanos en Barbados, el sureste de US, Esan, Gambia, Kenia, Sierra Leona y Nigeria. Dentro de estas poblaciones, destacan los africanos en Sierra Leone y Gambia, debido a que el SNP rs5743417 se encuentra presente en un porcentaje alto en estas poblaciones.

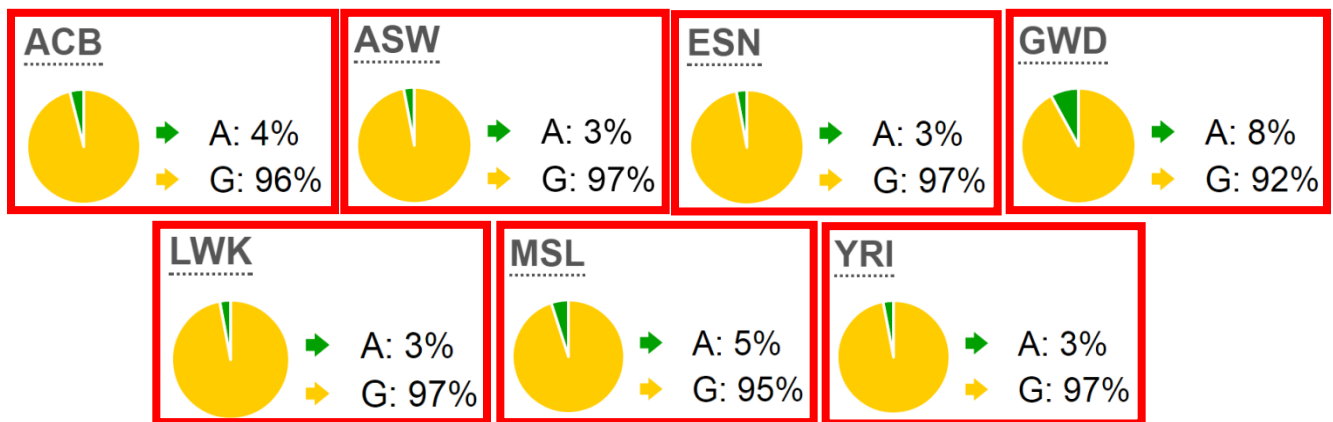


Figura 19. Porcentajes de las poblaciones africanas en donde el SNP rs5743417 se encuentra presente. ACB: población en Barbados, ASW: población en el sureste de US, ESN: población en Esan, GWD: población en Gambia, LWK: población en Kenia, MSL: población en Sierra Leona, YRI: población Yoruba en Nigeria. (ENSEMBL, [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=variation;vf=3112547](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=8:6877551-6878551;v=rs5743417;vdb=variation;vf=3112547)).

Tomando en cuenta esta información, es posible realizar una comparación específica con respecto a los datos referentes a los casos de TB y su asociación con VIH en estas poblaciones. Como modelo de esta comparación, si tomamos en consideración las poblaciones africanas en Sierra Leone y Gambia, cuyos porcentajes de presencia del SNP rs5743417 son los más altos (5% y 8% respectivamente), podemos obtener la información referente a: cantidad de población, incidencia de TB, incidencia de TB en asociación con VIH y mortalidad. Esto con el fin de tener una comparación específica con respecto a las enfermedades de estudio.

Tabla 7. Comparación de los datos poblacionales con respecto a TB y VIH [46].

	<b>Ponderación Sierra Leona/Gambia</b>	<b>Ponderación México/promedio de Sierra Leona y Gambia</b>
<b>Frecuencia del polimorfismo</b>	Alelo menor: $5/8=0.625$	Alelo menor: en población mexicana no se encuentra.
<b>Cantidad de población.</b>	$6'000,000/2'000,000=3$	$125'000,000/4'000,000=31.25$
<b>Incidencia de TB anual</b>	$25,000/4,000=6.25$	$29,000/14,500=2$
<b>Incidencia de TB en asociación VIH anual</b>	$3,000/930=3.23$	$2,400/1,965=1.22$
<b>Mortalidad (promedio anual)</b>	$3,900/470=8.3$	$2,100/2,185=0.96$

Esta información nos permite colocar puntos de contraste entre las comparaciones, por ejemplo; la población de Gambia tiene presente el SNP rs5743417 en el 8% de su población, considerando que su población aproximada es de 2'000,000 de personas, que su incidencia de TB es de 4000 nuevos casos, su incidencia de TB en asociación con VIH/SIDA es de 930 nuevos casos y su mortalidad es de 470 defunciones, podemos determinar que la incidencia anual de TB representa el 0.2% de su población, mientras que la incidencia anual de TB en asociación a VIH/SIDA representa el 0.0235% de su población. La población de Sierra Leone tiene presente el SNP rs5743417 en el 5% de su población, considerando que su población aproximada es de 6'000,000 de personas, que su incidencia de TB es de 25,000 nuevos casos, su incidencia de TB en asociación con VIH/SIDA es de 3,000 nuevos casos y su mortalidad es

de 3,900 defunciones, podemos determinar que la incidencia anual de TB representa el 0.42% de su población, mientras que la incidencia anual de TB en asociación a VIH/SIDA representa el 0.065% de su población. Ahora bien, tomando como contraste los datos correspondientes a población mexicana en donde el SNP rs5743417 no se encuentra presente, tenemos que; México tiene 125'000,000 de habitantes, la incidencia de TB es de 26,000 nuevos casos, la incidencia de TB en asociación con VIH/SIDA es de 2,400 nuevos casos y su mortalidad es de 2,100 defunciones [46], podemos determinar que la incidencia anual de TB representa el 0.0204% de la población, mientras que la incidencia anual de TB en asociación a VIH/SIDA representa el 0.002% de la población. Con esto podemos determinar que el problema de incidencia tanto de TB como en su asociación con VIH/SIDA, es un problema mayor en la población de Gambia y Sierra Leone en donde el SNP rs5743417 está presente, que en la población Mexicana en donde este SNP no está presente, aunque en estas dos poblaciones la exposición al patógeno es un riesgo constante. Esto no es una clara evidencia de que el SNP rs5743417 sea un factor principal en la susceptibilidad a TB y su asociación con VIH/SIDA en la población de Gambia y Sierra Leone, debido a que para ello, influyen muchos otros factores como lo son hábitos de higiene, cuestiones culturales, condiciones socioeconómicas, condiciones ambientales, etc. Sin embargo, nosotros proponemos la posibilidad de que no solo este tipo de factores influyen en la susceptibilidad a TB y VIH/SIDA, si no que los rasgos genéticos también son importantes en la susceptibilidad de estas enfermedades, siendo la parte novedosa la consideración específica de los polimorfismos SNPs seleccionados por el software SNPclinic, ya que como hemos comprobado a nivel *in vitro*, estos polimorfismos pueden alterar la expresión de genes importantes en la respuesta inmune en contra de enfermedades específicas, lo que podría considerarse como un factor crucial de susceptibilidad.

## 11. CONCLUSIONES

Nosotros identificamos algunos SNPs asociados como biomarcadores o en respuesta inmune en contra de TB y VIH/SIDA que podrían ser factores importantes en la susceptibilidad a estas enfermedades infecciosas. Estas sugerencias fueron obtenidas por el uso de un software llamado SNPCLINIC en su versión beta y versión 1. Sin embargo, una evaluación a nivel *in vitro* es necesaria para la validación de los datos obtenidos por el SNPCLINIC.

Nosotros demostramos por primera vez que el SNP rs5743417 en el promotor proximal del gen *DEFB1*, disminuyó la expresión del gen reportero *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa) significativamente (-32.64% de disminución con un p-value de 0.0298). Esto podría representar un importante factor en la susceptibilidad a una infección por tuberculosis, el virus de inmunodeficiencia humana adquirida o a la asociación de ambas enfermedades. Esto es debido a que es probable que el SNP rs5743417, altera la interacción entre el promotor del gen *DEFB1* y los factores de transcripción SREBF1 y CREB1, los cuales probablemente tienen un rol importante en la expresión del péptido hBD-1, que como fue descrito con anterioridad; este es un péptido antimicrobiano con funciones de defensa inmune tanto en contra de TB como de VIH/SIDA. Por lo tanto, si la expresión de péptido hBD-1 se ve disminuida por la presencia del SNP rs5743417 en individuos de una población en particular, esto podría representar un factor que influye en la susceptibilidad a las enfermedades antes mencionadas.

Ahora bien, este SNP afecta considerablemente a poblaciones africana y puertorriqueña; por lo tanto, nosotros sugerimos que las personas quienes poseen el SNP rs5743417 en estas poblaciones, podrían tener un relevante factor de riesgo para la susceptibilidad a TB y VIH/SIDA. Como sabemos, los rasgos genéticos entre poblaciones, tienen una gran variabilidad, entre estos rasgos, la presencia o ausencia de SNPs en ciertas poblaciones podría representar un factor importante en la susceptibilidad a TB y VIH/SIDA. Esto podría contribuir a determinar el por qué es posible que estas enfermedades tengan mayor impacto y difusión a través de ciertas poblaciones específicas, y como en otras pareciera que TB y su asociación con VIH/SIDA está mejor controlada. Sin mencionar que la variación genética entre individuos podría representar una debilidad inmune particular en el paciente que podría impactar directamente en contraer y desarrollar TB y VIH/SIDA. De esta manera, podría ser posible clasificar de manera individual, a las personas que podrían ser mayormente

susceptibles tanto para TB como VIH/SIDA, con el fin de realizar medidas preventivas que permitan disminuir el porcentaje de probabilidad de contraer y desarrollar estas terribles enfermedades. Con esto, fue resaltada la necesidad de estudiar a profundidad y sobre todo aplicar medicina personalizada que favorezca la lucha en contra de TB y VIH/SIDA.

Esta información resalta la importancia de los rasgos genéticos de una población con respecto a la susceptibilidad a enfermedades específicas, en particular, fue resaltada la importancia de los polimorfismos SNPs en la regulación de la expresión génica, que en caso de alterar genes importantes en la respuesta inmune, esto podría representar un factor de riesgo a considerar en la susceptibilidad a enfermedades. Esto también abre la posibilidad de que los rasgos genéticos individuales tengan un impacto considerable en la salud de un individuo, debido a que, si un polimorfismo SNP es capaz de alterar significativamente la expresión de genes relevantes en la respuesta inmune, esto podría representar una debilidad particular en el individuo que presenta esta modificación génica. Por lo tanto, la identificación de estos SNPs putativamente relevantes podría ser considerada como una herramienta de alto impacto en la medicina personalizada, ya que permitiría brindar acercamientos contundentes con respecto al entendimiento de la relación entre genética y susceptibilidad a enfermedades a nivel de un solo individuo. Cabe mencionar que para la aplicación de un concepto tan poco entendido como lo es la medicina personalizada, aún faltan muchos descubrimientos por realizar, sin embargo, confiamos en que investigaciones como esta, permitan resaltar la necesidad de enfocar los esfuerzos para generar herramientas que permitan comprender y utilizar la información generada hasta el momento con respecto a la genética humana y su relación en la susceptibilidad a enfermedades.

## 12. RECOMENDACIONES

En el transcurso del desarrollo de este proyecto, se presentaron algunos inconvenientes con la obtención de los vectores correspondientes al promotor proximal del gen *CAMP*. Esto fue ocasionado presumiblemente por que la secuencia promotor proximal del gen *CAMP* presenta un número considerable de secuencias repetidas de ADN y además, tiene un número considerable de secuencias invertidas de ADN. Esto al final puede ocasionar que la secuencia promotor sea destruida después de ser transformada en células *E. coli*. Existen algunas recomendaciones con respecto a esta situación que son importantes a considerar en etapas posteriores del proyecto.

Las características de una secuencia que será transformada en células *E. coli* pueden ser tóxicas para la bacteria en sí, por esta razón, si este es el caso, es posible intentar incubar los cultivos con la bacteria a temperaturas más bajas de crecimiento como lo son de 25 a 30°C, esto puede favorecer la replicación del plásmido que contiene la secuencia promotor que posiblemente es tóxica para *E. coli* sometida a la transformación. En caso de que esto no funcione adecuadamente, lo más probable es que será necesario realizar el proceso de transformación usando cepas que tienen un mayor control transcripcional sobre la secuencia promotor de interés. Una de las cepas comerciales que tiene una alta eficiencia de transformación es “NEB® 5-alpha F'Iq Competent *E. coli* (High Efficiency)”.

En caso de que la razón de que no se obtengan los resultados esperados después del proceso de transformación sea que los constructos posiblemente sean susceptibles a procesos de recombinación, también es recomendable cambiar el modelo biológico utilizado por uno que tenga propiedades de alta eficiencia de transformación. Cabe mencionar que en el desarrollo de este proyecto de tesis, se utilizó una cepa de *E. coli* electrocompetente que no tiene propiedades de alta eficiencia de transformación, por lo que es posible que utilizar este tipo de cepas, favorezca una disminución en el tiempo del proceso de generación de vectores necesarios para etapas posteriores de la investigación. En el caso de que se plantea la posibilidad de repetir el proceso de obtención de vectores de clonación correspondientes a la secuencia promotor proximal del gen *CAMP*, el siguiente diagrama podría ejemplificar cómo el SNP rs9844566 podría afectar la expresión del gen de estudio.

EVALUACIÓN IN VITRO DE POLIMORFISMOS (SNPs) PUTATIVAMENTE FUNCIONALES EN PROMOTOR PROXIMAL DE GENES RELEVANTES A TUBERCULOSIS Y VIH/SIDA

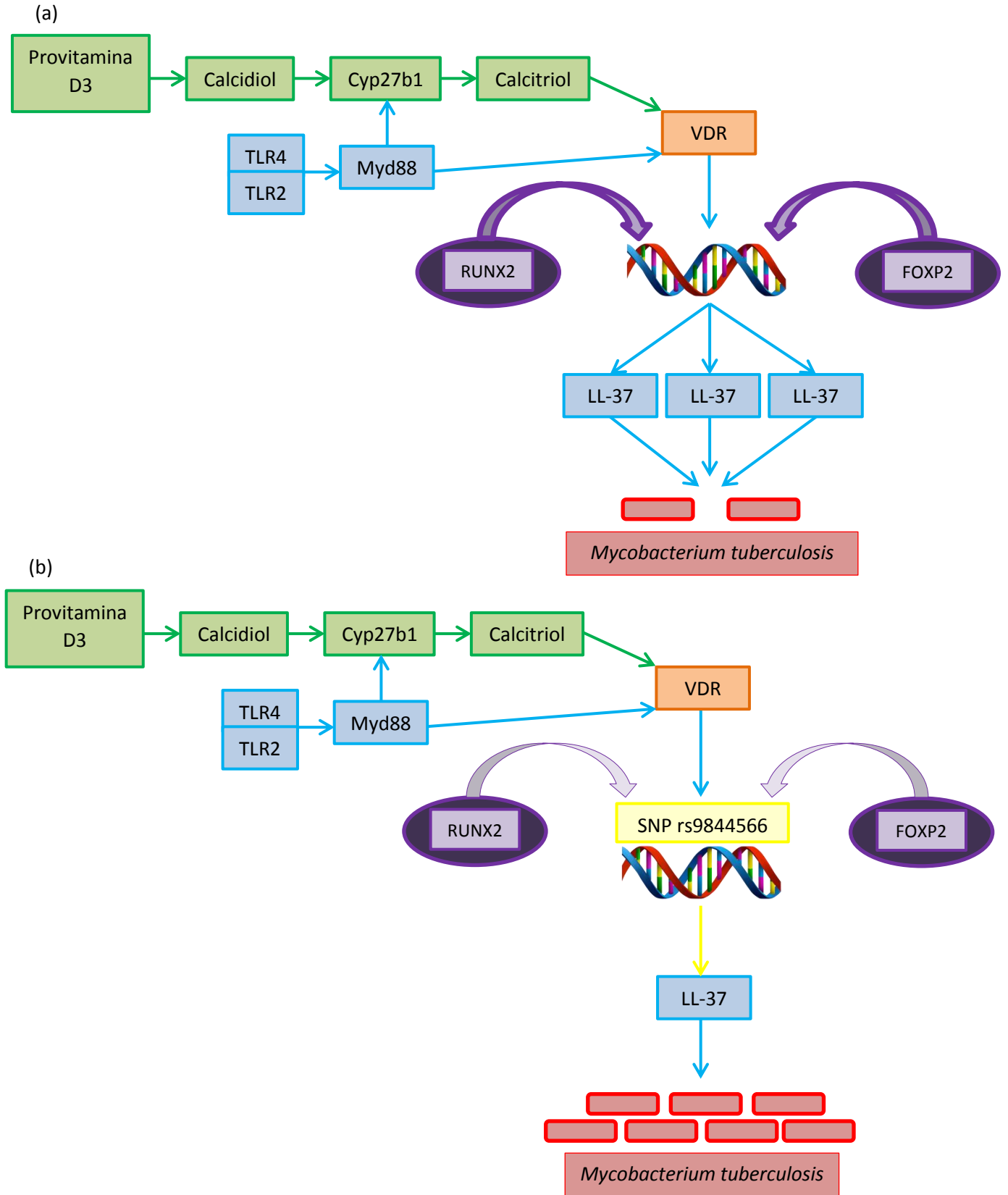


Figura 20. Posible alteración de la expresión genética, que es probablemente causada por la presencia del SNP rs9844566. (a) Cuando la secuencia promotora presenta los alelos mayores, los factores de transcripción RUNX2 y FOXP2, pueden interactuar adecuadamente con la secuencia de reconocimiento del promotor; esto permite la expresión suficiente del péptido Catelicidina LL-37 que podría disminuir el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis*. (b) cuando el promotor presenta el alelo menor (SNP rs9844566). Los factores de transcripción RUNX2 y FOXP2 no pueden interactuar adecuadamente con el sitio de reconocimiento del promotor, esto puede ocasionar la alteración en la expresión del gen *CAMP* que, a su vez, podría disminuir la cantidad del péptido LL-37; por lo tanto, *Mycobacterium tuberculosis* puede desarrollarse adecuadamente en ausencia de una respuesta inmune innata efectiva.



### 13. ANEXOS

#### 13.1. Secuencias nucleotídicas de los vectores y promotores utilizados.

##### 13.1.1. Vector pUC57 (2710 pb).

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC  
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCG  
TCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGA  
TTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAG  
AAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGG  
CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTG  
CAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAAC  
GACGGCCAGTGAATTGGAGATCGGTACTTCGCGAATGCGTCGAGATATCGGATGC  
CGGGACCGACGAGTGCAGAGGCGTGCAAGCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATA  
GCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCG  
GAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT  
TGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATT  
AATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGC  
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAG  
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA  
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGT  
TGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC  
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC  
CTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTG  
TCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTA  
TCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCG  
TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA  
AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA  
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
TAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA  
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTT  
TGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG  
ATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTT

GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAATGA  
AGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG  
CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTG  
CCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC  
CAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA  
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCG  
CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTT  
AATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC  
GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGAT  
CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGA  
AGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCT  
TACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGT  
CATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACG  
GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGT  
TCTTCGGGGCGAAA ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTA  
ACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTG  
GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACA  
CGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCA  
GGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAA  
ATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCA  
TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

13.1.2. Vector pCAT Basic Vector (4027 pb).

GGTACCGAGC TCTTACGCGT GCTAGCCCGG GCTCGAGATC TGCGATCTAA  
GTAAGCTTGC GGCCGCTTAA GCTGCAGAAG TTGGTCGTGA GGC ACTGGGC  
AGGTAAGTAT CAAGGTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAACTG  
GGCTTGTCGA GACAGAGAAG ACTCTTGCGT TTCTGATAGG CACCTATTGG  
TCTTACTGAC ATCCACTTTG CCTTTCTCTC CACAGGTGTC CACTCCCAGG  
TTCAATACAG CTCTTAAGCG GCCGCAAGCT TGCCGCCACC ATGGAGAAAA

AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT CCCAATGGCA TCGTAAAGAA  
CATTTTGAGG CATTTCAGTC AGTTGCTCAA TGTACCTATA ACCAGACCGT  
TCAGCTGGAT ATTACGGCCT TTTTAAAGAC CGTAAAGAAA AATAAGCACA  
AGTTTTATCC GGCCTTTATT CACATTCTTG CCCGCCTGAT GAATGCTCAT  
CCGGAACTCC GTATGGCAAT GAAAGACGGT GAGCTGGTGA TATGGGATAG  
TGTTACACCCT TGTTACACCG TTTTCCATGA GCAAACCTGAA ACGTTTTTCAT  
CGCTCTGGAG TGAATACCAC GACGATTTCC GGCAGTTTCT ACACATATAT  
TCGCAAGATG TGGCGTGTTA CGGTGAAAAC CTGGCCTATT TCCCTAAAGG  
GTTTATTGAG AATATGTTTT TCGTCTCAGC CAATCCCTGG GTGAGTTTCA  
CCAGTTTTGA TTAAACGTG GCCAATATGG ACAACTTCTT CGCCCCCGTT  
TTCACGATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC GACAAGGTGC TGATGCCGCT  
GGCGATTCAG GTTCATCATG CCGTTTGTGA TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA  
TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA  
TCTAGAGTCG GGGCGGCCGG CCGCTTCGAG CAGACATGAT AAGATACATT  
GATGAGTTTG GACAAACCAC AACTAGAATG CAGTGAAAAA AATGCTTTAT  
TTGTGAAATT TGTGATGCTA TTGCTTTATT TGTAACCATT ATAAGCTGCA  
ATAAACAAGT TAACAACAAC AATTGCATTC ATTTTATGTT TCAGGTTTCAG  
GGGGAGGTGT GGGAGGTTTT TTAAAGCAAG TAAAACCTCT ACAAATGTGG  
TAAAATCGAT AAGGATCCGT CGACCGATGC CCTTGAGAGC CTTCAACCCA  
GTCAGCTCCT TCCGGTGGGC GCGGGGCATG ACTATCGTCG CCGCACTTAT  
GACTGTCTTC TTTATCATGC AACTCGTAGG ACAGGTGCCG GCAGCGCTCT  
TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTT GGCTGCGGCG  
AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG  
GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG

AACCGTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC  
TGACGAGCAT CACAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA  
CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC  
TCTCCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC  
TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT  
CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT  
CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC  
GGTAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA  
GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT  
AACTACGGCT AACTAGAAG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA  
GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA  
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC  
AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA  
CGCTCAGTGG AACGAAAAC CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT  
CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTA AAAATG AAGTTTAAA  
TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT  
AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTCGT TCATCCATAG  
TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA  
TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC  
AGATTTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG  
GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA  
GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT  
TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA  
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC

AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT  
GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA  
CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GACTCAACC  
AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC  
GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA  
TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG  
TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACCT GATCTTCAGC  
ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA  
ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA  
CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT  
GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGGTTC  
CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACCTG ACGCGCCCTG TAGCGGGCGCA  
TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG CTACACTTGC  
CAGCGCCCTA GCGCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCTTCC TTTCTCGCCA  
CGTTCGCCGG CTTTCCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT CCCTTTAGGG  
TTCCGATTTA GTGCTTTACG GCACCTCGAC CCCAAAAAAC TTGATTAGGG  
TGATGGTTCA CGTAGTGGGC CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTCGCCCTT  
TGACGTTGGA GTCCACGTTT TTAATAGTG GACTCTTGTT CCAAACCTGGA  
ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT AAGGGATTTT  
GCCGATTTTCG GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA CAAAATTTA  
ACGCGAATTT TAACAAAATA TTAACGCTTA CAATTTGCCA TTCGCCATTC  
AGGCTGCGCA ACTGTTGGGA AGGGCGATCG GTGCGGGCCT CTTCGCTATT  
ACGCCAGCCC AAGCTACCAT GATAAGTAAG TAATATTAAG GTACGGGAGG  
TACTTGAGC GGCCGCAATA AAATATCTTT ATTTTCATTA CATCTGTGTG

TTGGTTTTTT GTGTGAATCG ATAGTACTAA CATACGCTCT CCATCAA AAC  
AAAACGAAAC AAAACAAACT AGCAAATAG GCTGTCCCA GTGCAAGTGC  
AGGTGCCAGA ACATTTCTCT ATCGATA

13.1.3. Promotor del gen *DEFBI* (2000 pb).

GGTGGGATTACAGGTGTGTGCCACCACACCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAAG  
GACGGGGCTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTAACCTCAGGCGAT  
CTGCCCCGCTCGGCCTCCAGAGTGTTAGGATTACAGACGTGAGCCACTGCGCCC  
TGACCGGTTGCATTCTTTGAATTTATTATAAGTCTTTCCAAAAAAGTTAATCGAA  
ATACGCATGTATCTCTGGGAGCAAAAAGATGACTTGAATAGAAAAAGAGGCAGA  
TTCGAATAAGCAGTTCAGCTTGAAGGTGCCCGAGATATTTTTCTTTCACAATC  
TTATTGAACCCACACCTGGTGTAAACCTGGAAGCCTCCCCAGGAGGCGGTCAG  
CACAGAGGCTAGGGAATGAGGCTTTCAGGCCATTATACCAGTTTTCCATTTACCA  
GCAGGGTGACCTTGGGCAATTTGTTTCAATTCTCTGAACCCAGTGTTTTTCTTCTC  
TAACATGAGGATTATATTGCCTGGTCAAAGAATCATAGTGTGGCTTCAATAAGAC  
AGAAGGAAAGGGACAGAAACAGATCCGATAGAATACTGTAGCTAGCTCATTGAG  
GCAGTTCACAGACGGTGTGTTGGGAGGAACTTGAAGAGGCTGAGCCATGTCTTAC  
CCAGCACCAGCAAGGAAAGCTGTGTTTCGGTCTTTCTTTTTCTTTCCACAATCTC  
ACTGCTCCTAGGTCAGGCATGGCTCAGCCTCTTCCAAGTTTTCTCCAAACACCCT  
TTGTGAACTGCCTCAATGAGCTAGCTACAGGATCCCAGTGCATCTTTCTGTCTCCT  
TCTTTCTGTCTCTCTGAATCTATTTCTCTCTATCTCTCTCTCTCTCTATTTCCATC  
TCTCTCTGTCTGTTTCTATCTCTCTGTTTCTCTGTGTCTCTCTACTGTCTCTGCA  
GTCTCTGTCTCTTCTCTGTCTCTGTTTTGTTTGTCCATCTTTCTGGATCTCTCTCT  
GTCTTTCTCTGGCAGGTTGAAGTGGGAGTATACGGCAGGTTTCATGTTTGGGTGCA  
GAATGGCATTCTGCCAGCGGTAGAGTGGCTGAGGGTCACTCCACTCTGGGTGTCT  
CATGCCATGTGGCTGCAGTATGGGGTCTCATTGGACCACCGTGACAGTGTAGGG  
TGGATGTCATTCCCTGGAAACTGAGCCTCAAGCTGGGTCTCCAGCAATGCCACCA  
CCCCCACCAACCCTGATATCCTCCGAATAAACTCTTCCCTTCTTGGTCAGCGAG  
AGCCAGCGTCTGCTGCTTGCAAATAAGCCACTGAGACATCAGGAAAGCTGCTCAC

AGAATTACAATGAAAATCAGTAATAAATAAAAATGTTTCTTAAATCTTTAGAATCA  
AGGAAAACCTGAGGGATACTTGGAGAGTCGCTAACAGCACCCCAATCTGGCAGTT  
GTAGCTCTGCAGGGTGGGCCCAAGCTGGGCCAGACCCTCACCTCCAAGGGCCAC  
ACTGGGGGCTCACTTTCTGAGGAGTGCCCTTTGGAAACGTCCCAGGAACACGTCT  
AGTGGGAAAAGAGAAAAGTTGGTCCATCGAGGAGAGTGTTCTGCATAAGGGGAG  
AGATGAGAAGGTAGCCTTGGCCAGAGGAAGAACTTCATTACAACCAGCTCTCCT  
TCTGCAAGGGAAGAGGGTGAAGTTTGAGTTTGTCTTGCAGGAAGACAATCAA  
AAAGAGGCCAACACCAGCTTAGAGCCGAGCGGCCCCCTGCTCAGAGCTTCCCTGT  
GGCTCTCCTCCATGTGATCCAGAAGGAGGGACTCCAGTGTGAACTGCCTGTTCCA  
GAAACCCCATCAGAACTGCCTAACCTAGAAAACCAAACAGGAGGAGCTGGCACC  
AGGGCTCCAGGCTGAAAGCTAAATCCAGCGGCAGCCAGATGGAGACAATGTGCC  
ATGTGACTGCTGACTGCTCAGGGCAAATGACACCAGGGGTTAGCGATTAGAAGTT  
CACC

13.1.4. Promotor del gen *CAMP* (2000 pb).

TTCCACCTTCCAGGAGCCCTGCTGTCCAAGCCCCAAGTGTCCCACAGGCCAACTG  
AGGTCAAGAGGTACCCAGGCCTCAGGGCCACATGGCCAGTCCACAGAGGAGCT  
GGGACCGGAATTTGCCTCATGGACGCTGGACCCCTCTATCACTTTGGCCCTTTATC  
TCTCCTGGCTGTGATCTCTCCCTCTCCCAACACCAGCCACCCATCCCAGCTTGGTG  
TCTCAGCTAGAGCACCAAACAGGGAGTAATTTGAGGTTCGAATCAGGAGAGACTTC  
CTGGAAGATGTAGGGGCAAAGAGGAGATTGCTGTGCCTGGTTGGAGGTCAGGGA  
AAGCTTCATGAGGTGAAAGGGCAGGCCAAACAGAAGGATCGGGGCAGAGCTGGG  
AGAAAGAGCAGGAGGCTCAGATGAGCCTATGTGATGGGGGCATACGTGACAGTC  
TGGCACTTGCAGTGTGCAGGGCTGGGGTGAGGGCAGTGGGAACCAAAGGCCAC  
AGGCCCTGATGCCAGCCTAGGGGGTGTGTGGGCTCCTGAAGGTAGAGGGTTGAAA  
TGGCCAAATTGGTGGTTTAAAGGAACCCCTGGACAACGGTGTGGAGGGTGGACTG  
TGGTCTGGGGAGAGCCTGAAACCTAGAGAAGGTGGAGTCTGGAGGCTGGGGCAG  
CATTGCATGGGAGAGAAGATGGCGGCAGGAGCCAGGCAGGGGTGGAAGGAGAG  
GCCAGAGGGGAGTGCTTTCGGGAGGAAGGAGCCAAAGGTGCTTCAGGGCTCATG  
CAGTGGGCACTCAGCAGAAGAGCAGTCAAGGAGGCCAGTGGGGACAACCGGGA

CGTTCATGGGAGTCTCGAACTCAGAGATACAGACTGGGTGGTGTCTGCCTATTAT  
AACTGGTGTCTTGGGAGAGGGCGTCCCCAGGGAAACCCGAGGCCAGGGAAAGAGA  
AGCAGCCCAGGAGGTGACCCACACGCTCTCAATATTAAGAAGACAGCCCTTAGG  
GGAGACCAAGAAGGAGCCACCAGGGAGGCAGGAGGGACAGCAGGAGAGTGGCA  
TCAGGGGAGACCGGGGCAGCAAGAAGGAAGGCTCACCAGTGCCTGTGCAGACAA  
AGACCAGGCTTGAGGGTGGCCATGGACCAAGGGTGGGTTGGCCAGCCTTCAGTGG  
CCTTCAGCATGAAGAAGAGTGAAAAGATGGGGTCAAGAAGCGTAGACAACCTTT  
CCTAAGACTTGGCTTGGGAGAAGCCATGGTGAAAGGCCATGTCTGGAGGGGCTTG  
GGAACATTTTGAGACTGAAAAAACAGTGAAGAAGGATGCAGAAGGGGATAGAT  
GGAGCAGAGCCTTCGTCTGGCTGACGGCTGGGTCCAGAGAGCATGTGGTATGGCC  
TTGAACTGAAAGGGCAACTTGTCCCTTGCAAGAGTGAGTCTCTAGGTTGGGGGTG  
GCTACTGTCTTCATTTACCAGTTCTTTTTTTTTTTTTTTCATACTGAGTCTCACTCTGT  
TACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATCTCAGCTAACTGCAACTTCTGCTTCCCC  
GGTTCAATGGGTTCAAGTGATTCTCATGCCTCAGCTTGTAGCTGGGACTACAGGTG  
TGAGCCATCATGCGTGGCTAATTTTCATATTTTATAGTAGAGATGGGGTTTCACCAT  
GTTGGCCAAGCTTGTCTCGAACTCCTTATCTCAGGTGATCCGCCACCTTGGCCTC  
CCAAAGTGCTGGGATTATAGGCGTGAGCCACCGTGCCCTGCCTCATTCATCAATTC  
TTAATCGATGCCTACAGGGTGCCAGGCAATGCCTAGAGCTGGAGATTTAGCAGTC  
CATCATACTGACTCCTGAGGAGTAGAAGGATGTAGAATAGGCACCTGGCTCTCTT  
CCTCTCTGGAGGGATTTAACGCTCTTGAGCACCCCTGGCTATGACAATCTCCGGTC  
AGGTCTGGGAGGTTGTCAGAGATGAAGAAACCACTTCCTCATCTTGCACACAAGG  
AAGGCCTCACTCACTGCCCAGCAA



## 14. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. M. Lewandowski, “WHO Global tuberculosis report 2015,” *Eff. Br. mindfulness Interv. acute pain Exp. An Exam. Individ. Differ.*, vol. 1, pp. 1689–1699, 2015.
- [2] J. E. Galagan, “Genomic insights into tuberculosis,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 5, pp. 307–320, 2014.
- [3] Organización Panamericana de la Salud (OPS), “La Tuberculosis en la Región de las Américas, informe regional 2012”: *epidemiología*, 2013.
- [4] World Health Organization, “Global tuberculosis report 2015,” 2015.
- [5] R. M. B. Teles, T. G. Graeber, S. R. Krutzik, M. Schenk, D. J. Lee, E. Komisopoulou, R. Chun, S. S. Iyer, E. N. Sarno, H. Thomas, M. Hewison, J. S. Adams, S. J. Popper, and a David, “Type I Interferon Suppresses Type II Interferon – Triggered Human Anti- Mycobacterial Responses,” *Sci. Express*, vol. 1448, no. February, pp. 1–7, 2013.
- [6] S. Ding, L. Li, and X. Zhu, “Polymorphism of the interferon- $\gamma$  gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population,” *Hum. Immunol.*, vol. 69, no. 2, pp. 129–133, 2008.
- [7] H. W. Tso, W. K. Ip, W. P. Chong, C. M. Tam, a K. S. Chiang, and Y. L. Lau, “Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese.,” *Genes Immun.*, vol. 6, no. 4, pp. 358–363, 2005.
- [8] P. Knauth, T. Schlüter, M. Czubayko, C. Kirsch, V. Florian, S. Schreckenberger, H. Hahn, and R. Bohnensack, “Functions of sorting nexin 17 domains and recognition motif for P-selectin trafficking,” *J. Mol. Biol.*, vol. 347, no. 4, pp. 813–825, 2005.
- [9] H. Mukae, J. Ashitani, M. Tokojima, T. Ihi, S. Kohno, and S. Matsukura, “Elevated levels of circulating adhesion molecules in patients with active pulmonary tuberculosis.,” *Respirology*, vol. 8, no. 3, pp. 326–331, 2003.
- [10] L. M. Verhagen, A. Zomer, M. Maes, J. a Villalba, B. Del Nogal, M. Eleveld, S. A. van Hijum, J. H. de Waard, and P. W. Hermans, “A predictive signature gene set for discriminating active from latent tuberculosis in Warao Amerindian children.,” *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 74, 2013.
- [11] G. S. Kumar, A. K. Venugopal, A. Mahadevan, and S. Renuse, “Quantitative proteomics for identifying biomarkers for tuberculous meningitis,” *Clin. Proteomics*, vol. 10, no. 1, p. 3, 2013.
- [12] H. Yamada, E. Ohashi, T. Abe, N. Kusumi, S. Li, Y. Yoshida, M. Watanabe, K. Tomizawa, Y. Kashiwakura, H. Kumon, H. Matsui, and K. Takei, “Amphiphysin 1 Is Important for Actin Polymerization during Phagocytosis,” vol. 18, no. November, pp. 4669–4680, 2007.
- [13] I. Vergne, J. Chua, S. B. Singh, and V. Deretic, “Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome.,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, pp. 367–394, 2004.
- [14] M. Kjolby, M. S. Nielsen, and C. M. Petersen, “Sortilin, Encoded by the Cardiovascular

- Risk Gene SORT1, and Its Suggested Functions in Cardiovascular Disease,” *Curr. Atheroscler. Rep.*, vol. 17, no. 4, pp. 1–9, 2015.
- [15] A. K. Pandey and C. M. Sasseti, “Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 11, pp. 4376–80, 2008.
- [16] J. Gatfield and J. Pieters, “Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages,” *Science*, vol. 288, no. 5471, pp. 1647–1650, 2000.
- [17] P. Arvind, J. Nair, S. Jambunathan, V. V. Kakkar, and J. Shanker, “CELSR2-PSRC1-SORT1 gene expression and association with coronary artery disease and plasma lipid levels in an Asian Indian cohort,” *J. Cardiol.*, pp. 1–8, 2014.
- [18] L. J. Montaner, P. Griffin, and S. Gordon, “Interleukin-10 inhibits initial reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and mediates a virostatic latent state in primary blood-derived human macrophages in vitro,” *J. Gen. Virol.*, vol. 75 ( Pt 12, no. 1994, pp. 3393–400, 1994.
- [19] T. R. Kollmann, M. Pettoello-Mantovani, N. F. Katopodis, M. Hachamovitch, A. Rubinstein, A. Kim, and H. Goldstein, “Inhibition of acute in vivo human immunodeficiency virus infection by human interleukin 10 treatment of SCID mice implanted with human fetal thymus and liver,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 7, pp. 3126–3131, 1996.
- [20] X. Gao, J. Chen, Z. Tong, G. Yang, Y. Yao, F. Xu, and J. Zhou, “Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis: A Meta-Analysis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 1, pp. 1–16, 2015.
- [21] C. H. Kim, S. S. Yoo, S. Y. Lee, S. I. Cha, J. Y. Park, and J. Lee, “Post-treatment change in Mycobacterium tuberculosis antigen- stimulated tumor necrosis factor-alpha release in patients with active tuberculosis,” vol. 7, no. 5, pp. 903–907, 2015.
- [22] B. M. Saunders, H. Briscoe, and W. J. Britton, “T cell-derived tumour necrosis factor is essential, but not sufficient, for protection against Mycobacterium tuberculosis infection,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 137, no. 2, pp. 279–287, 2004.
- [23] G. N. López Campos, J. S. Velarde Félix, L. Sandoval Ramírez, S. Cázares Salazar, A. L. Corona Nakamura, G. Amaya Tapia, and E. Prado Montes de Oca, “Polymorphism in cathelicidin gene (CAMP) that alters Hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ :: ARNT) binding is not associated with tuberculosis,” *Int. J. Immunogenet.*, vol. 41, no. 1, pp. 54–62, 2014.
- [24] R. Freguja, K. Gianesin, M. Zanchetta, and A. De Rossi, “Cross-talk between virus and host innate immunity in pediatric HIV-1 infection and disease progression,” *New Microbiol.*, vol. 35, no. 3, pp. 249–57, 2012.
- [25] L. Fattorini, R. Gennaro, M. Zanetti, D. Tan, L. Brunori, F. Giannoni, M. Pardini, and G. Orefici, “In vitro activity of protegrin-1 and beta-defensin-1, alone and in combination with isoniazid, against Mycobacterium tuberculosis,” *Peptides*, vol. 25, no. 7, pp. 1075–1077, 2004.

- [26] A. R. Martineau, K. A. Wilkinson, S. M. Newton, R. A. Floto, A. W. Norman, K. Skolimowska, R. N. Davidson, O. E. Sorensen, B. Kampmann, C. J. Griffiths, and R. J. Wilkinson, "IFN- $\gamma$  and TNF-Independent Vitamin D-Inducible Human Suppression of Mycobacteria: The Role of Cathelicidin LL-37," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 11, pp. 7190–7198, 2007.
- [27] A. R. Martineau, S. M. Newton, K. A. Wilkinson, B. Kampmann, B. M. Hall, N. Nawroly, G. E. Packe, R. N. Davidson, C. J. Griffiths, and R. J. Wilkinson, "Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 7, pp. 1988–1994, 2007.
- [28] P. T. Liu, S. Stenger, D. H. Tang, and R. L. Modlin, "Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 4, pp. 2060–2063, Aug. 2007.
- [29] A. Yamshchikov, and E. Kurbatova, "Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis," *Am. J.*, vol. 92, no. 3, pp. 603–611, 2010.
- [30] G. R. Campbell, and S. a. Spector, "Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages through the induction of autophagy," *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 5, 2012.
- [31] J. A. Estrada-Aguirre, I. Osuna-Ramírez, E. P. M. de Oca, L. A. Ochoa-Ramirez, M. Ramirez, L. G. Magallon-Zazueta, M. S. Gonzalez-Beltran, S. G. Cazarez-Salazar, H. Rangel-Villalobos, and J. S. Velarde-Felix, "DEFB1 5'UTR Polymorphisms Modulate the Risk of HIV-1 Infection in Mexican Women," *Curr. HIV Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 220–6, 2014.
- [32] W. Xiao-mai, G. Liu-yang, and L. Jian, "Association between human beta defensin-1 single nucleotide polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis," *Chin J Prev Med.*, vol. 1, no. 2, pp. 75–80, 2012.
- [33] S. L. Deshmane, S. Amini, S. Sen, K. Khalili, and B. E. Sawaya, "Regulation of the HIV-1 promoter by HIF-1 $\alpha$  and Vpr proteins," *Viol. J.*, vol. 8, no. 1, p. 477, 2011.
- [34] H. Qu and X. Fang, "A Brief Review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) Project," *Genomics, Proteomics Bioinforma.*, vol. 11, no. 3, pp. 135–141, 2013.
- [35] L. Siggins and K. Ekwall, "Epigenetics, chromatin and genome organization: Recent advances from the ENCODE project," *J. Intern. Med.*, vol. 276, no. 3, pp. 201–214, 2014.
- [36] M. A. Schaub, A. P. Boyle, A. Kundaje, S. Batzoglou, and M. Snyder, "Linking disease associations with regulatory information in the human genome," *Genome Res.*, vol. 22, no. 9, pp. 1748–1759, 2012.
- [37] A. A. Kalus, L. P. Fredericks, B. M. Hacker, H. Dommisch, R. B. Presland, J. R. Kimball, and B. A. Dale, "Association of a genetic polymorphism (-44 C/G SNP) in the human DEFB1 gene with expression and inducibility of multiple beta-defensins in

- gingival keratinocytes.” *BMC Oral Health*, vol. 9, p. 21, 2009.
- [38] E. Prado Montes De Oca, “Human polymorphisms as clinical predictors in leprosy,” *J. Trop. Med.*, vol. 2011, 2011.
- [39] E. Prado-Montes de Oca, J. S. Velarde-Félix, J. J. Ríos-Tostado, V. J. Picos-Cárdenas, and L. E. Figuera, “SNP 668C (-44) alters a NF- $\kappa$ B1 putative binding site in non-coding strand of human  $\beta$ -defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 9, no. 4, pp. 617–625, 2009.
- [40] A. Flores-Saiffe Farías, E. J. Herrera-López, C. J. Moreno-Vázquez, W. Li, and E. P. M. de Oca, “Predicting functional regulatory SNPs in the human antimicrobial peptide genes DEFB1 and CAMP in tuberculosis and HIV/AIDS,” *Comput. Biol. Chem.*, vol. 59, pp. 117–125, 2015.
- [41] Chavez Alvarez y cols., en proceso
- [42] M. Wegrecki, O. Rodríguez-Galán, J. de la Cruz, and J. Bravo, “The structure of Erb1-Ytm1 complex reveals the functional importance of a high-affinity binding between two  $\beta$ -propellers during the assembly of large ribosomal subunits in eukaryotes,” *Nucleic Acids Res.*, p. gkv1043, 2015.
- [43] C. J. Kelly, L. E. Glover, E. L. Campbell, D. J. Kominsky, S. F. Ehrentraut, B. E. Bowers, A. J. Bayless, B. J. Saeedi, and S. P. Colgan, “Fundamental role for HIF-1 $\alpha$  in constitutive expression of human  $\beta$  defensin-1,” *Mucosal Immunol.*, vol. 6, no. 6, pp. 1110–8, 2013.
- [44] E. W. Tiemersma, M. J. van der Werf, M. W. Borgdorff, B. G. Williams, and N. J. D. Nagelkerke, “Natural history of tuberculosis: Duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: A systematic review,” *PLoS One*, vol. 6, no. 4, 2011.
- [45] Y. Akhter, S. Yellaboina, A. Farhana, A. Ranjan, N. Ahmed, and S. E. Hasnain, “Genome scale portrait of cAMP-receptor protein (CRP) regulons in mycobacteria points to their role in pathogenesis,” *Gene*, vol. 407, no. 1–2, pp. 148–158, 2008.
- [46] World Health Organization, “Global Tuberculosis Report 2015,” *World Heal. Organ.*, p. 306, 2013.
- [47] R. Bals, “Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection.” *Respir. Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 141–150, 2000.
- [48] A. P. Ramos and C. P. Desgarenes, “Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel,” pp. 57–67, 2007.
- [49] C. L. Bevins, E. Martin-Porter, and T. Ganz, “Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract.” *Gut*, vol. 45, no. 6, pp. 911–915, 1999.
- [50] C. Fulton, G. M. Anderson, M. Zasloff, and R. Bull, “Expression of natural peptide antibiotics in human skin Management of pelvic floor dysfunction Loss of aura in lamotrigine-treated epilepsy,” vol. 350, pp. 1996–1997, 1997.

- [51] K. W. Bensch, M. Raida, H.-J. Mägert, P. Schulz-Knappe, and W.-G. Forssmann, "hBD-1: a novel  $\beta$ -defensin from human plasma," *FEBS Lett.*, vol. 368, no. 2, pp. 331–335, 1995.
- [52] K. Nakamura, N. Sakuragi, A. Takakuwa, and T. Ayabe, "Paneth cell  $\alpha$ -defensins and enteric microbiota in health and disease," *Biosci. Microbiota, Food Heal.*, vol. 35, no. 2, pp. 57–67, 2016.
- [53] B. Agerberth, J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jörnvall, H. Wigzell, and G. H. Gudmundsson, "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations.," *Blood*, vol. 96, no. 9, pp. 3086–3093, 2000.
- [54] M. Pazgier, D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, and J. Lubkowski, "Human  $\alpha$ -defensins," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 11, pp. 1294–1313, 2006.
- [55] J. J. Schneider, A. Unholzer, M. Schaller, M. Schäfer-Korting, and H. C. Korting, "Human defensins," *J. Mol. Med.*, vol. 83, no. 8, pp. 587–595, 2005.
- [56] M. J. Goldman, G. M. Anderson, E. D. Stolzenberg, U. P. Kari, M. Zasloff, and J. M. Wilson, "Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis," *Cell*, vol. 88, pp. 553–560, 1997.
- [57] J. M. Schröder, "Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements," *Cell Mol Life Sci*, págs. 32–46, 1999.
- [58] L. Braidia, M. Boniotto, A. Pontillo, et al., "A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children," *AIDS*, págs. 1598-600, 2004.
- [59] R. Bals, "Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection," *Respir Res*. págs. 141-150, 2000.
- [60] I. Bello, M. R. Rizo, C. B. Badel, E. Blanco, C. Valenzuela, M. del Rosario, M. R. Quiroga, R. B. Bayard, J. C. Saldivar, and P. Lopez-Saura, "In vitro interferon gamma regulation of CCR-3 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from atopic asthmatics.," *Clin. Exp. Med.*, vol. 1, no. 2, pp. 75–80, 2001.
- [61] J. Johansson, G. H. Gudmundsson, M. E. Rottenberg, K. D. Berndt, and B. Agerberth, "Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 6, pp. 3718–3724, 1998.
- [62] U. H. N. Dürr, U. S. Sudheendra, and A. Ramamoorthy, "LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1758, no. 9, pp. 1408–1425, 2006.
- [63] D. M. E. Bowdish, D. J. Davidson, D. P. Speert, and R. E. W. Hancock, "The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes.," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 6, pp. 3758–3765, 2004.

- [64] J. Yu, N. Mookherjee, K. Wee, M. E. Dawn, J. Pistolic, Y. Li, L. Rehaume, R. E. W. Hancock, and D. M. E. Bowdish, "Host Defense Peptide LL-37, in Synergy with Inflammatory Mediator IL-1B, Augments Immune Responses by Multiple Pathways," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 11, pp. 7684–7691, 2012.
- [65] B. Agerberth, J. Charo, J. Werr, et al., "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations," *Blood*. pp 3086-3093, 2000.
- [66] M. Pazgier, D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, J. Lubkowski. "Human beta-defensins," *Cell Mol Life Sci*. pp.1294-1313, 2006.
- [67] R. De Jiang, H. Shen, and Y. J. Piao, "The morphometrical analysis on the ultrastructure of a549 cells," *Rom. J. Morphol. Embryol.*, vol. 51, no. 4, pp. 663–667, 2010.
- [68] S. Fan, L. Jiang, J. Wu, L. Dong, Q. Cheng, P. Xu, and S. Zhang, "A Novel Pathogenesis-Related Class 10 Protein Gly m 4I, Increases Resistance upon *Phytophthora sojae* Infection in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.)," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, p. e0140364, 2015.
- [69] P. A. Gagniuc and C. Ionescu-Tirgoviste, "Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters," *BMC Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 512, 2012.
- [70] P. Gagniuc and C. Ionescu-Tirgoviste, "Gene promoters show chromosome-specificity and reveal chromosome territories in humans.," *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 278, 2013.
- [71] J. Ramírez-Bello, G. Vargas-Alarcón, C. Tovilla-Zárate, and J. M. Fragoso, "Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas," *Gac. Med. Mex.*, vol. 149, no. 2, pp. 220–228, 2013.
- [72] P. Vliet, *Roles of Transcription Factors in DNA Replication*. 1996.
- [73] C. O. Pabo and R. T. Sauer, "Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, pp. 1053–1095, 1992.
- [74] S. Ogbourne and T. M. Antalis, "Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes.," *Biochem. J.*, vol. 331 ( Pt 1, pp. 1–14, 1998.
- [75] M. Kininis and W. L. Kraus, "A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis.," *Nucl. Recept. Signal.*, vol. 6, p. e005, 2008.
- [76] P. N. Rangarajan and G. Padmanaban, "Factors regulating the transcription of eukaryotic protein coding genes and their mechanism of action - A review," *J. Biosci.*, vol. 14, no. 2, pp. 189–202, 1989.
- [77] A. E. Kornienko, P. M. Guenzl, D. P. Barlow, and F. M. Pauler, "Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription.," *BMC Biol.*, vol. 11, no. 1, p. 59, 2013.



- [78] M. Kellis, B. Wold, M. P. Snyder, B. E. Bernstein, et al., "Defining functional DNA elements in the human genome.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 17, pp. 6131–8, 2014.
- [79] M. Yavartanoo and J. K. Choi, "ENCODE: A Sourcebook of Epigenomes and Chromatin Language," *Genomics Inf.*, vol. 11, no. 1, pp. 2–6, 2013.
- [80] Promega, "pCAT®3 Reporter Vectors Instructions for use of productS E1851, E1861, E1871 and E1881," 2015.
- [81] W. Hoskyns, "Paediatric tuberculosis.," *Postgrad. Med. J.*, vol. 79, no. 931, pp. 272–278, 2003.
- [82] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, p. e45, 2001.
- [83] E. Prado-Montes de Oca, "Human  $\beta$ -defensin 1: A restless warrior against allergies, infections and cancer," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 42, no. 6, pp. 800–804, 2010.
- [84] P. K. Singh, H. P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B. a Conway, E. P. Greenberg, E. V Valore, M. J. Welsh, T. Ganz, B. F. Tack, and P. B. McCray, "Production of beta-defensins by human airway epithelia.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 25, pp. 14961–14966, 1998.
- [85] L. Segat, L. Zupin, R. R. Moura, A. V. C. Coelho, B. S. Chagas, A. C. de Freitas, and S. Crovella, "DEFB1 polymorphisms are involved in susceptibility to human papillomavirus infection in Brazilian gynaecological patients," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 109, no. 7, pp. 918–922, 2014.
- [86] Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [87] Sambrook and Russell, "Molecular cloning a laboratory manual," Cold spring harbor laboratory press, 2008.
- [88] Y. Chen, S. Bang, M. F. McMullen, H. Kazi, K. Talbot, M. X. Ho, G. Carlson, S. E. Arnold, W. Y. Ong, and S. F. Kim, "Neuronal Activity-Induced Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBP1) is Disrupted in Dysbindin-Null Mice—Potential Link to Cognitive Impairment in Schizophrenia," *Mol. Neurobiol.*, vol. 1, pp. 1–11, 2016.
- [89] K. M. Sakamoto and D. A. Frank, "CREB in the pathophysiology of cancer: Implications for targeting transcription factors for cancer therapy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 8, pp. 2583–2587, 2009.
- [90] N. E. Van Der Sligte, K. R. Kampen, A. Elst, F. J. G. Scherpen, T. G. J. M. De Boer, V. Guryev, F. N. Van Leeuwen, M. Steven, and E. S. J. M. De Bont, "Essential role for cyclic-AMP responsive element binding protein 1 ( CREB ) in the survival of acute lymphoblastic leukemia," vol. 1, no. 17, 2015.