



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**“ISAMEL COSÍO VILLEGAS”**

**“ESTUDIO DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS MULTIFARMACO  
RESISTENTE: EVALUACIÓN DE INTERFERÓN- $\gamma$  COMO RESPUESTA  
A TRATAMIENTO”**

**TESIS QUE PRESENTA LA**

**DRA. MARCELA VERÓNICA MUÑOZ TORRICO**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE**

**NEUMOLOGIA**

**ASESORES:**

**DRA. MARTHA TORRES ROJAS**

**M. en C. YOLANDA GONZALEZ HERNANDEZ**



**MEXICO D.F.**

**AGOSTO 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DOCTOR**  
**JORGE SALAS HERNANDEZ**  
**DIRECCION DE EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**DOCTOR**  
**JUAN CARLOS VAZQUEZ GARCIA**  
**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUMOLOGIA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**DOCTORA**  
**MARTHA TORRES ROJAS**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN MICROBIOLOGIA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**M. en C.**  
**YOLANDA GONZALEZ HERNANDEZ**  
**INVESTIGADOR EN CIENCIAS MEDICAS B**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN MICROBIOLOGIA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

*“La libertad exterior que alcancemos depende del grado de libertad interior que hayamos adquirido.*

*Sí es esa la correcta comprensión de la libertad, nuestro esfuerzo principal debe centrarse en realizar un cambio en nosotros mismos”*

*Mahatma Gandhi*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre por ser mi pilar, por ser siempre la luz en mi camino, por toda la entrega y confianza depositada en mí a través de la distancia y el tiempo.

Al servicio de Investigación en Microbiología, por el apoyo prestado en tiempo, espacio y dedicación para la realización de esta tesis.

A mi tutora la Dra. Martha Torres Rojas por creer en mí y sembrar en mí de la duda y la continua búsqueda de respuestas.

De manera especial a Yolanda, por ser mi amiga y mi guía en todo momento.

## INDICE

Resumen .....	1
Antecedentes .....	2
Mecanismos de respuesta inmune contra la tuberculosis.....	3
Células mediadoras de la respuesta inmune celular.....	5
Citocinas mediadoras.....	7
Mecanismos de resistencia de MTB. ....	9
Situación actual de la Tuberculosis multifarmaco-resistente (TB-MFR).....	13
Ensayos Inmunológicos de liberación de IFN- $\gamma$ .....	16
Utilidad del ELISpot en el seguimiento de pacientes con tuberculosis activa .....	17
Justificación .....	20
Hipótesis .....	21
Objetivos .....	21
Métodos .....	22
Criterios de inclusión .....	23
Criterios de exclusión.....	23
Criterios de eliminación.....	24
Procedimiento de evaluación .....	24
Evaluación clínica .....	24
Evaluación bacteriológica: .....	25
Evaluación inmunológica .....	26
Antígenos .....	26
Análisis de la técnica ELISpot .....	27
Resultados .....	28
Discusión.....	37
Conclusiones.....	41

Referencias .....	42
Anexo 1 .....	47
Anexo 2 .....	49

## ABREVIATURAS

<b>CFP-10</b>	Culture filtrate protein 10
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>ELISpot</b>	Enzyme-linked Immunospot
<b>ESAT-6</b>	Early secretory antigenic target 6
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gamma
<b>IGRA</b>	IFN- $\gamma$ release assays
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PPD</b>	Derivado proteico Purificado
<b>RD-1</b>	Region de diferenciación 1
<b>TAES</b>	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>TB FS</b>	Tuberculosis Fármaco Sensible
<b>TB-XDR</b>	Tuberculosis Extremadamente Resistente
<b>TB MFR</b>	Tuberculosis Multifármaco-resistente
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>UFS</b>	Unidades Formadoras de spots

## RESUMEN

La presencia de cepas de *M. Tuberculosis* (MTB) multifármaco-resistente se ha convertido en un problema de salud mundial. El seguimiento de estos pacientes se realiza con cultivos para MTB sin embargo, este método es tardado y retrasa la posibilidad de efectuar cambios terapéuticos oportunos. En este proyecto se propone utilizar la técnica de ELISpot para cuantificar células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a los antígenos micobacterianos: ESAT-6 y PPD como una medida indirecta de la carga bacteriana.

**Métodos:** Se incluyeron pacientes con TB pulmonar MFR y FS, en tratamiento antituberculosis con esquema TAES. Se tomaron muestra de sangre para ELISpot y esputo para cultivo de MTB al inicio, 3, 6, 12, 15 y 18 meses respectivamente en el grupo con TB MFR. En el grupo con TB FS las muestras se tomaron al inicio 2 y 6 meses.

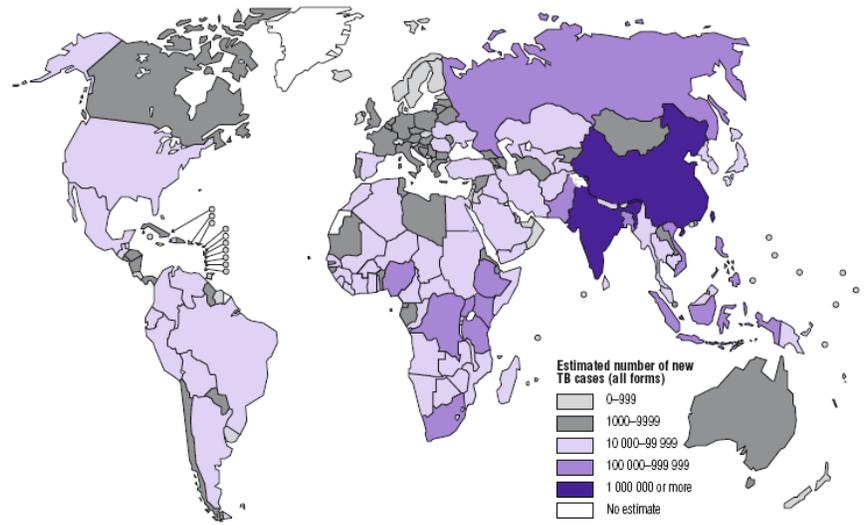
**Resultados.** En el grupo con TB MFR se incluyeron 11 pacientes. Los cultivos de esputo para MTB fueron negativos a los 6 meses de tratamiento y a los 18 meses 7 de 11 pacientes cumplieron con los criterios de curación; 3 pacientes fueron catalogados como término de tratamiento; y hubo 1 paciente con fracaso cuyos cultivos permanecieron positivos durante todo el seguimiento. El ELISpot fue positivo al inicio del tratamiento en 6 de 11 pacientes y a los 18 meses persistieron positivos en 6 de 8 pacientes. Los resultados de ELISpot no mostraron correlación con los resultados de cultivo, ni se encontró un patrón en concordancia con la eficacia o falla al tratamiento antituberculosis. El 82% de los pacientes incluidos tiene antecedente de DM2, en ellos no se observa un incremento significativo de las UFS durante los 18 meses de seguimiento ( $P=0.573$ ), en comparación con el grupo sin DM2 en quienes se incrementa la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  de manera significativa a los 15 meses de tratamiento ( $P=0.023$ ).

**Conclusiones:** Nuestros resultados demostraron que la técnica ELISpot no es útil en el seguimiento de pacientes con TB MFR y que el cultivo para MTB sigue siendo la prueba de mayor utilidad en este tipo de pacientes.

## ANTECEDENTES

La tuberculosis es un problema global de salud, cerca de la tercera parte de la población mundial ha sido infectada con *M. tuberculosis* (MTB) y aproximadamente del 5 al 10% de las personas que se infectan por primera vez están en riesgo de desarrollar la enfermedad activa. Según el reporte de la OMS del 2008, el número estimado de nuevos casos de tuberculosis en el 2006 fue de 9,2 millones (139 por 100 000 habitantes), entre ellos 4,1 millones de casos con baciloscopías positivas (44% del total). Con una cifra estimada de defunciones de 1,7 millones, incluidos 0,2 millones de personas infectadas por el VIH. El 83% del total de casos se localizó en las Regiones de África, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (Figura 1)(1). Para el mismo año se estimó que existen cerca de 0,5 millones de casos de tuberculosis multidrogo-resistente ó multifármaco-resistente(TB MFR). En México, de acuerdo a la OMS en el 2006 se reportaron 22473 nuevos casos (21 por 100 000 habitantes) con una mortalidad de 2128 (2%) y se estima que alrededor del 60% de la población mexicana está infectada con *M. tuberculosis*. (2)

El éxito en el tratamiento de la tuberculosis es importante no solo para la curación de la enfermedad sino también para evitar su transmisión, es así que la detección oportuna y el tratamiento adecuado son piezas clave para el control de la enfermedad. La efectividad del tratamiento de primera línea para tuberculosis fármaco sensible (TBFS) es cercana al 90%, en cambio en los casos de TB MFR la eficacia es muy variable se ha descrito entre el 30 al 60%. (3)



**Figura 1.** Número de casos nuevos de Tuberculosis para el 2006. Reporte de la OMS 2008

### **Mecanismos de respuesta inmune contra la tuberculosis.**

La transmisión del MTB ocurre predominantemente a través de la inhalación de gotas de saliva que contienen bacilos provenientes de personas enfermas, una vez inhaladas, los bacilos ingresan a los alveolos donde se encuentran con los macrófagos alveolares y las células epiteliales. De esta forma, se inicia toda una serie de eventos celulares que involucra la liberación de citocinas que activan tanto la inmunidad innata como la adaptativa. De este primer contacto depende la evolución de la enfermedad, se considera que un pequeño porcentaje de individuos es capaz de controlar la infección localmente debido a una eficiente inmunidad innata (5%), en la gran mayoría de individuos (el 90%), la inmunidad innata es incapaz por si sola de controlar la infección y es necesario la activación de la inmunidad adaptativa, sin que se logre la eliminación total de MTB, por lo tanto, este grupo de pacientes permanece con una infección

latente la cual se puede reactivar en el momento en que la vigilancia inmunológica se debilita como es el caso de los pacientes con infección por VIH. Otro porcentaje, aproximadamente el 5% de individuos infectados, la infección progresa a enfermedad dentro de los dos años posteriores a la infección.

Siendo la vía aérea la principal forma de transmisión de MTB, los macrófagos alveolares representan la primera línea de defensa frente a la infección por tuberculosis, participan en la muerte de MTB y son al mismo tiempo el reservorio donde MTB logra sobrevivir (4,5). Los mecanismos por los que MTB es capaz de sobrevivir dentro los macrófagos, incluyen: inhibición de la fusión fago-lisosomal (6,7), inhibición la acidificación del fagosoma (8) y además, MTB es resistente a los mecanismos de destrucción mediados por reactivos intermediarios de oxígeno y los reactivos mediados de nitrógeno (9,10,11).

Las micobacterias fagocitadas por los macrófagos alveolares que escapan a la lisis intracelular se multiplican e inducen una respuesta pro-inflamatoria localizada, asociada con la liberación de TNF- $\alpha$  y otras citocinas y quimiocinas encargadas de atraer al sitio de infección monocitos de sangre periférica, células dentríticas, linfocitos, células NK, NKT y neutrófilos. Estas células que también producen sus propias citocinas y amplifican la respuesta inflamatoria posteriormente serán las encargadas de formar el granuloma característico de la infección por MTB. Aproximadamente de 2 a 3 semanas después de la infección se desarrolla la inmunidad adaptativa mediada por células T. La respuesta inmune es incapaz de destruir a MTB pero si capaz de controlar la progresión de la enfermedad, a través de la formación de granulomas que contienen la infección dentro de una gruesa capsula fibrótica formada por macrófagos, neutrófilos,

macrófagos grasosos, células gigantes y un infiltrado linfocitario alrededor del mismo, el granuloma es una estructura altamente vascularizada capaz de evitar la progresión de la infección a enfermedad (5).

### **Células mediadoras de la respuesta inmune celular**

El éxito de la erradicación o limitación de la infección por MTB depende de la interacción entre los macrófagos infectados y los linfocitos T. La respuesta adecuada de las células T depende sobre todo del reconocimiento de antígenos específicos, el cual se desarrolla principalmente, en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo I y tipo II.

**Linfocitos T CD4<sup>+</sup>:** son células muy importantes para el desarrollo de la respuesta inmune celular contra MTB (12), como lo ha demostrado la actual pandemia del VIH donde la destrucción de estas células hace mas susceptible a estos pacientes a presentar una progresión mas rápida de una infección reciente a enfermedad activa o a la reactivación de una infección latente hasta 10% por año (13).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Reconocen a antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas del MCH II. Los antígenos micobacterianos inmunodominantes para las celulas T CD4<sup>+</sup>, incluyen: la proteína de 30-32KD, ESAT-6 y CFP 10, lipoproteínas de 19 y 38 kDa y dos proteínas de 32 kDa (proteasa de serina) y 39 kD. (12)

Se han descrito 2 subgrupos de linfocitos TCD4<sup>+</sup>: las células TH1 productoras de citocinas proinflamatorias como; IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12; y las células TH2 productoras de IL-4, IL-5, e IL-13. Además estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados expresan granzimas, Fas-

L (CD95L), granulinsina, y perforina. En la infección por MTB la respuesta TH1 es la más importante.

**Linfocitos T CD8<sup>+</sup>:** reconocen antígenos presentados en la superficie de las células en el contexto de moléculas del MHC clase I. Las células CD8<sup>+</sup> juegan un rol importante en la modulación de la respuesta, dan balance a la respuesta por TH1 y TH2 a través de la secreción de citocinas como IFN- $\gamma$  y otras citocinas. Son capaces de lisar los macrófagos infectados. No se conoce del todo como los antígenos de MTB tienen acceso a las moléculas de clase I, ya que MTB es un microorganismo que reside dentro la vacuola del macrófago, y para tener acceso al MHC tipo I debe ser primero transportado al citoplasma. En la actualidad hay evidencia que el bacilo se encuentra fuera de las vacuolas después de 4-5 días de la infección, aunque la presentación a través del MHC tipo I puede ocurrir incluso a las 12hrs de la infección (4). Los antígenos micobacterianos presentados para activar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> incluyen proteínas de choque de 38 kDa, 65 kDa, proteína de 19 kDa y proteínas de secreción de la micobacteria como son ESAT 6 y CFP-10. (12)

**Reconocimiento de antígenos micobacterianos en el contexto CD1:** El CD1 es una molécula presentadora con una estructura similar al MHC de tipo I. CD1 está presente en las células dendríticas y monocitos, tiene la capacidad de presentar antígenos lipídicos de la micobacteria, entre ellos el ácido micólico, LAM, fosfatidil inositol manosido, monomicolato de glucosa, glicolípidos de isoprenoides. Habitualmente los linfocitos CD8<sup>+</sup> se activan a partir de CD1 aunque en la actualidad hay evidencia que los linfocitos CD4<sup>+</sup> también tienen capacidad de reconocer esta molécula. (4,14)

**Linfocitos  $\gamma/\delta$ :** se cree que son muy importantes en la respuesta inmune protectora hacia MTB, se activan por vías alternas que no incluyen la participación de la presentación a través de las moléculas del MHC. Reconocen moléculas que contienen pequeñas cantidades de fosfato como el prenilfosfato (12). Los linfocitos  $\gamma/\delta$  secretan IFN- $\gamma$ , tienen función citotóxica sobre el macrófago infectado y además secretan citocinas importantes para la formación del granuloma. Hay estudios que demuestran que en pacientes infectados por MTB, los linfocitos  $\gamma/\delta$  representan hasta el 25-30% del total de la población de linfocitos (15).

### **Citocinas mediadoras:**

**Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ):** Es la citocina más importante en el control de la infección por MTB, regula la respuesta inmune y es secretada por varios tipos de linfocitos T, siendo los más importantes los Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los TCD8<sup>+</sup>. Las citocinas inductoras de IFN- $\gamma$  comprenden: IL-12, IL-23 e IL-27 (16). Los individuos con defectos en la producción o en el receptor para IFN- $\gamma$  son susceptibles a infecciones serias, diseminadas o mortales por MTB. Esta citocina activa a los macrófagos para destruir los bacilos intracelulares a través de la inducción de la óxido nítrico sintetasa. El IFN- $\gamma$  es un regulador crítico en función de las células presentadoras de antígenos porque incrementa la expresión de moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras. (4,15)

Aunque el IFN- $\gamma$  juega un papel importante en el control de la infección por MTB, por sí solo es insuficiente para controlar la infección. La producción es variable en cada individuo, se ha sugerido como un marcador de la infección por MTB y algunos estudios indican que los niveles en sangre periférica están disminuidos en pacientes

con TB activa y que correlaciona con la extensión de la enfermedad a nivel pulmonar (17).

**Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ):** juega un papel muy importante y complejo en la respuesta inmunopatológica a la infección por MTB, esta induce la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos, células dendríticas y los linfocitos T. En pacientes con tuberculosis está presente en el sitio de la enfermedad y a nivel sistémico es responsable de algunos efectos inflamatorios como la fiebre y la consunción que presentan estos pacientes, se ha asociado el deterioro clínico del paciente con niveles elevados de TNF- $\alpha$  en plasma, mientras que la recuperación se asocia con un decremento rápido del mismo. Por otra parte, esta citocina es necesaria para el control de la infección aguda por MTB, su acción se sinergiza con el IFN- $\gamma$  para la inducción de la apoptosis de los macrófagos alveolares infectados. (4,5,15)

El TNF- $\alpha$  juega un papel muy importante en la formación y la persistencia del granuloma para contener la infección por MTB y por lo tanto prevenir la diseminación de la infección. Se ha demostrado en ratones, que en ausencia de TNF- $\alpha$  y/o de su receptor, la respuesta granulomatosa es ineficiente y esto resulta en una muerte rápida con un gran carga bacilar; por otro lado, los granulomas que se forman son desorganizados, con pocas células epitelioides alrededor y con linfocitos defectuosos. La importancia del TNF- $\alpha$  para contener la infección latente se ha corroborado en los seres humanos a partir del uso de los fármacos anti-TNF's (adalimumab, infliximab) útiles en el manejo de enfermedades reumatológicas, en quienes se ha reactivado la infección latente por MTB (18).

Además el TNF- $\alpha$  está implicado en la respuesta inmunopatológica del huésped a la infección por MTB y es un mediador muy importante en la destrucción de los pulmones por necrosis secundaria a la infección por MTB. Hay estudios en los que se ha encontrado que existen niveles elevados de TNF- $\alpha$  en el sitio de infección, en comparación con niveles sistémicos demostrando la “compartimentalización” de la respuesta inmune a MTB. (19)

### **Mecanismos de resistencia de MTB.**

Todos los seres vivos a través del paso de los años sufren mutaciones genéticas con el fin de perpetuar la especie, las bacterias son particularmente susceptibles al desarrollo de resistencias dado su gran número, la rapidez de multiplicación y el uso indiscriminado e inadecuado de antibióticos. La resistencia de MTB a los fármacos antituberculosis es una característica que ha acompañado al bacilo desde sus orígenes, muy a pesar de su baja tasa de multiplicación, el bacilo en su continua división ha presentado múltiples mutaciones genéticas, algunas de las cuales afectan los sitios de acción de los fármacos antituberculosis, confiriendo resistencia a la acción de los mismos. (20)

La tasa de mutaciones genéticas para conferir resistencia es muy baja y diferente para cada fármaco (Tabla 1). El número de bacilos estimados en las diferentes formas clínicas es muy variable (Tabla 2) y este factor se debe de tomar en cuenta al iniciar el uso de fármacos antituberculosis, así, el número de bacilos presentes en una lesión determina la frecuencia de bacilos con resistencia natural a los fármacos empleados. Al iniciar el tratamiento antituberculosis con un solo fármaco, si bien inicialmente se va

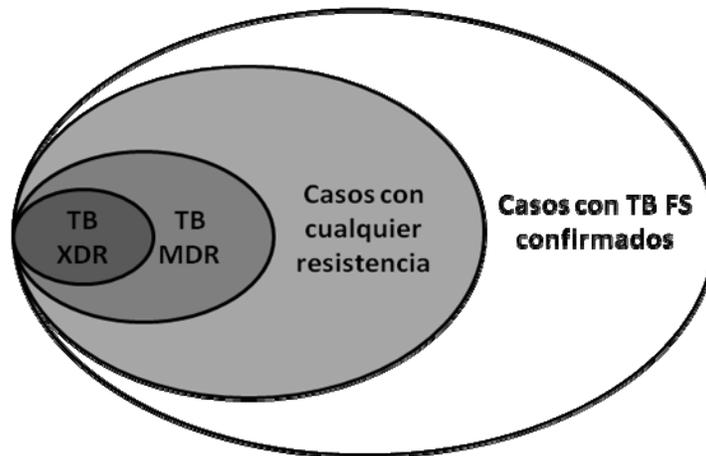
presentar un período de mejoría por la gran destrucción bacilar, posteriormente se van a seleccionar aquellos bacilos resistentes que en poco tiempo será la población dominante y por lo tanto el fármaco utilizado ya no será de utilidad. De esto podemos definir que toda monoterapia ya sea real o encubierta llevará ineludiblemente al fracaso y a la selección de resistencias (Figura 2).

**Tabla 1.** Mutantes resistentes según la población bacilar

<b>Isoniacida</b>	$1 \times 10^5$ - $10^6$ Bacilos
<b>Rifampicina</b>	$1 \times 10^7$ - $10^8$ Bacilos
<b>Estreptomcina</b>	$1 \times 10^5$ - $10^6$ Bacilos
<b>Etambutol</b>	$1 \times 10^5$ - $10^6$ Bacilos
<b>Pirazinamida</b>	$1 \times 10^2$ - $10^4$ Bacilos
<b>Quinolonas</b>	$1 \times 10^5$ - $10^6$ Bacilos
<b>Resto</b>	$1 \times 10^5$ - $10^6$ Bacilos

**Tabla 2.** Carga bacilar según la lesión radiológica

<b>TB BK(+)</b>	$10^7$ - $10^9$ Bacilos
<b>Cavitaria</b>	$10^7$ - $10^9$ Bacilos
<b>Infiltrado</b>	$10^4$ - $10^7$ Bacilos
<b>Nódulos</b>	$10^4$ - $10^6$ Bacilos
<b>Adenopatías</b>	$10^4$ - $10^6$ Bacilos
<b>TB Renal</b>	$10^7$ - $10^9$ Bacilos
<b>TB Extrapulmonar</b>	$10^4$ - $10^6$ Bacilos



**Figura 2.** La resistencia de MTB está originada por la selección de cepas resistentes por esquemas de tratamiento inadecuados. (Idea original Dr. Peter Cegielski) (21)

En tuberculosis existen 2 tipos de resistencias: la *resistencia natural*, es aquella que se presenta en las cepas salvajes como resultado de la multiplicación continua que al alcanzar cierto número de bacilos se produce una mutación genética espontánea en un bacilo concreto, pero esta resistencia debe ser seleccionada por los fármacos para que se exprese. Por otro lado, tenemos la *resistencia adquirida o secundaria* que se produce por una mala terapéutica (monoterapia real o encubierta) detrás de la cual, siempre se encuentra un error humano ya sea por el médico que prescribe una mala pauta de tratamiento o el enfermo al no cumplir el tratamiento de manera adecuada. En resumen, el uso de los fármacos anti-tuberculosis, no son los causales de las mutaciones genéticas, pero si son responsables de la selección de los bacilos resistentes. (20)

La resistencia conjunta a la isoniacida y rifampicina es un evento muy grave y define al grupo de pacientes con Tuberculosis Multifarmaco-resistente (TB-MFR). A partir de una mala pauta de tratamiento para este grupo de pacientes aparece la Tuberculosis

extensamente resistente (TB-XDR) la cual se define por la resistencia a una quinolona y un aminoglucósido además de la resistencia a la isoniacida y rifampicina.

En la actualidad, se han podido identificar por técnicas de biología molecular las diferentes mutaciones genéticas que confieren resistencia a los fármacos antituberculosis. En el 90-98% de los casos de resistencia a la rifampicina se asocia a la mutación del gen *rpoB*. Esta mutación no produce ninguna alteración en la virulencia del bacilo y se mantiene la misma capacidad infectante y de desarrollar enfermedad en todos los individuos. La resistencia a la isoniacida es más compleja ya que son varias mutaciones genéticas que pueden condicionarla, en el 22-64% de los casos se encuentra la mutación del gen *KatG* el cual afecta la actividad catalasa y peroxidasa del bacilo, enzimas que además de conferir resistencia a la isoniacida son importantes para la vida del bacilo y supervivencia intracelular por lo tanto en este caso si hay una disminución de la virulencia del bacilo. Otros genes implicados en la resistencia a isoniacida son *inhA*, *ahpC*, *KasA*. Otras mutaciones genéticas que confieren resistencia a los fármacos anti-tuberculosis de primera y de segunda línea se exponen en la Tabla 3. (3,22)

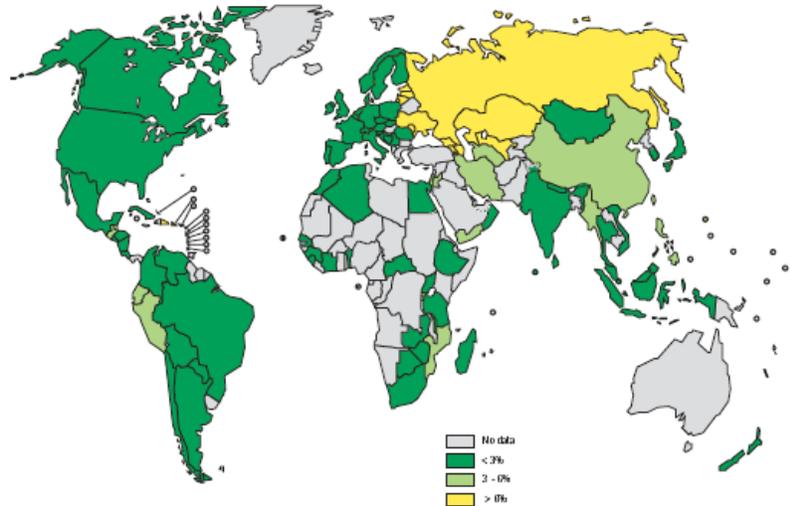
**Tabla 3.** Mutaciones genéticas de MTB que confieren resistencia.

<b>Fármaco</b>	<b>Mutación</b>	<b>Porcentaje de mutaciones</b>
Isoniacida	<i>KatG</i>	40 – 60
Isoniacida – Etionamida	<i>inhA</i>	15 – 43
Isoniacida	<i>ahpC</i>	10
Isoniacida	<i>kasA</i>	Desconocido
Rifampicina	<i>rpoB</i>	>96
Pirazinamida	<i>pncA</i>	72-97
Etambutol	<i>embB</i>	47-65
Estreptomina	<i>rpsL</i>	70
Estreptomina	<i>rrs</i>	70
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	75 – 94

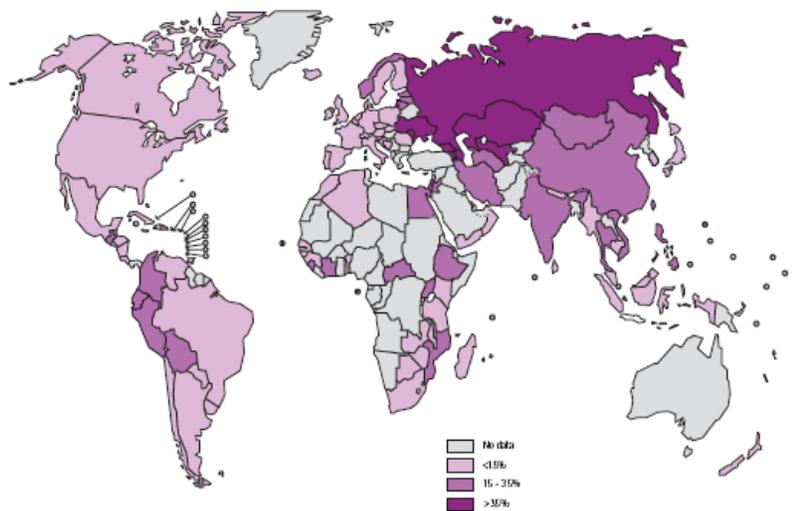
### **Situación actual de la Tuberculosis multifarmaco-resistente (TB-MFR)**

La presencia de tuberculosis MFR y la XDR correlacionan de manera inversa con la calidad de los programas de tratamiento contra la tuberculosis donde el factor más importante es el uso adecuado de los fármacos antituberculosis.

La OMS en su reporte del 2008, refiere que la cifra estimada de casos de tuberculosis MFR para el 2006 fue de 489,139 que representa 4.8% del número total de casos estimados para ese año en 185 países. El 50% de los casos de TB MFR están en tan solo 2 países China e India y el 7% en la Federación Rusa. (2)



**Figura 3.** Casos nuevos de TB MFR 1994 -2007



**Figura 4.** Casos de TB MFR en pacientes previamente tratados

En Latinoamérica en general la prevalencia de TB MFR es baja, según el reporte de la OMS, el número de casos con TB MFR para el 2006 fue de 12,070, es decir el 3.5%. Los países con mayor número de casos reportados fueron Perú, Guatemala y Ecuador. En México, en un estudio realizado en el INDRE entre 1989 y 1993 se evaluaron 18,111 cultivos para MTB procedentes de diferentes partes de la república y se encontró una resistencia primaria en 8.3% de los casos. En 1997 la Secretaría de

Salud en colaboración con el CDC realizó un programa de vigilancia nacional para determinar la resistencia de MTB a los diferentes fármacos antituberculosis de primera línea, el cual representa el primer estudio en población al azar de resistencia de MTB realizado en la república mexicana. En este estudio se dio seguimiento en 3 estados: Oaxaca, Sinaloa y Baja California y partir de estos estudios se estima la prevalencia de multiresistencia en toda la república encontrando que la tasa de TB MFR en casos nuevos fue del 2.4% y en casos con tratamiento previo fue del 22.4% (23).

Los reportes de eficacia del tratamiento para TB MFR son muy divergentes, depende de la eficacia del programa nacional de control de la tuberculosis en cada país y del número de pacientes tratados. La presencia de TB MFR se ha convertido en un problema de salud pública, con una clara tendencia al ascenso por la falta de programas nacionales de supervisión, la prescripción de tratamientos no estandarizados, la falta de acceso a fármacos de segunda línea, los costos elevados de los mismos, la falta de adherencia de los pacientes al tratamiento, la ausencia de un control regular de las infecciones nosocomiales y el tiempo prolongado de tratamiento. (24)

El tratamiento de los pacientes con tuberculosis se debe realizar adherido a un programa nacional de supervisión, se debe administrar el tratamiento bajo el esquema TAES (tratamiento estrictamente supervisado) implementado por la OMS desde 1993. El seguimiento de estos pacientes debe ser estrecho, se debe realizar una monitorización clínica y de laboratorio en búsqueda de los efectos adversos de los fármacos utilizados. La monitorización bacteriológica es la piedra angular para evaluar la eficacia del tratamiento con fármacos de segunda línea, se realiza a través de

baciloscopías seriadas. Aunque el “estándar de oro” es el cultivo, por las características de lento crecimiento de MTB éste método es tardado y retrasa la posibilidad de efectuar cambios terapéuticos oportunos muy a pesar de los avances que existen en la actualidad. Por lo tanto, hasta el momento no se cuenta con un marcador clínico, bacteriológico o serológico que de manera temprana pueda predecir el fracaso al tratamiento en este grupo de enfermos. La importancia de determinar de manera temprana el fracaso al tratamiento de segunda línea radica en la mayor posibilidad de realizar una implementación o modificación del tratamiento que resulte eficaz.

### **Ensayos Inmunológicos de liberación de IFN- $\gamma$**

Durante los últimos años, los avances en la tecnología nos han permitido comprender mejor los diferentes mecanismos inmunológicos desencadenados por la infección por MTB, y además al descifrar el genoma del bacilo se han podido determinar aquellos segmentos propios que lo diferencian de otras micobacterias ambientales o que se perdieron en aquellas cepas utilizadas para obtener la vacuna. Un ejemplo de estos son los antígenos ESAT 6 (*early secretory antigenic target 6*) y CFP-10 (*culture filtrate protein 10*) codificados en un segmento denominado como “región de diferenciación-1” (RD-1), ambos antígenos son importantes en la activación de las células T e inducen la producción de IFN- $\gamma$  (Tabla 4).(25)

**Tabla 4.** Distribución de ESAT-6 y CFP-10 en las diferentes especies de Micobacterias

Complejo de <b>M. tuberculosis</b>	Antígenos		Micobacterias ambientales	Antígenos	
	ESAT-6	CFP-10		ESAT-6	CFP-10
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	<i>M. abcessuss</i>	-	-
<i>M. Africanum</i>	+	+	<i>M. avium</i>	-	-
<i>M. Bovis</i>	+	+	<i>M. branderi</i>	-	-
<b>Cepas presentes en la vacuna BCG</b>			<i>M. celatum</i>	-	-
Gothenburg	-	-	<i>M. chelonae</i>	-	-
Moreau	-	-	<i>M. fortuitum</i>	-	-
Tice	-	-	<i>M. gordonii</i>	-	-
Tokyo	-	-	<i>M. intracellulare</i>	-	-
Danish	-	-	<i>M. kansasii</i>	+	+
Glaxo	-	-	<i>M. malmoense</i>	-	-
Montreal	-	-	<i>M. oenavense</i>	-	-
Pateur	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
			<i>M smegmatis</i>	-	-
			<i>M. szulgai</i>	+	+
			<i>M. terrae</i>	-	-
			<i>M. xenopi</i>	-	-

A partir de estos descubrimientos se han desarrollado nuevos sistemas de detección temprana de la tuberculosis y del diagnóstico de la infección latente por MTB. Estas técnicas en su conjunto se han denominados como “IFN- $\gamma$  release assays” (IGRA). En la actualidad existen 2 sistemas comerciales para determinar la producción de IFN- $\gamma$ : QuantiFeron y ELISpot. (25,26)

#### **Utilidad del ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) en el seguimiento de pacientes con tuberculosis activa**

La técnica de ELISpot desarrollada en Inglaterra en la década de los 90, permite identificar las células T antígeno-específicas productoras de IFN- $\gamma$ . El fundamento de esta técnica se basa en que las células T de un individuo previamente infectado por MTB al exponerse in vitro a los antígenos: ESAT-6 y CFP 10 liberan IFN- $\gamma$ . La técnica

de ELISpot se ha utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis activa con una sensibilidad del 83-97% y especificidad del 100%. (26)

A diferencia de otras infecciones, en la infección por MTB no se puede cuantificar de manera objetiva la carga bacilar presente al momento del diagnóstico o durante el seguimiento de la enfermedad, de manera indirecta se ha utilizado la técnica de ELISpot donde se cuantifica el número de células T específicas a antígenos propios de MTB. Se propone que durante la enfermedad activa con replicación constante de la micobacteria existe una gran carga antigénica y por lo tanto el número de células T efectoras está elevado, después de un período de tratamiento exitoso la carga antigénica disminuye y por lo tanto disminuye el número de células T productoras de IFN-  $\gamma$ , con un promedio de descenso aproximado de 5.5% por semana. (27)

Hasta el momento, los estudios de seguimiento del tratamiento de la TB activa utilizando la técnica de ELISpot han mostrado resultados prometedores. Los resultados de Carrara y col. demostraron correlación de la negativización de los cultivos y de los resultado de ELISpot en el seguimiento a 3 meses en 13 de los 18 pacientes incluidos en el estudio, de los 5 pacientes restantes que persistieron con cultivos positivos presentaban enfermedad extensa y un pobre estado nutricional, sin embargo, en el seguimiento a los 6 meses todos negativizaron tanto cultivo como ELISpot.(28) En otro estudio realizado con 89 pacientes en Gambia a 12 meses de seguimiento el 96% (82) de los pacientes con tratamiento concluido y con criterios de curación fueron negativos para ELISpot. (29)

Hasta el momento los diferentes estudios realizados han demostrado de manera objetiva el descenso significativo del ELISpot en el seguimiento del tratamiento de los

pacientes con TB activa, sin embargo, el valor diagnóstico de la técnica de ELISpot en pacientes con tuberculosis MFR en la población mexicana, no ha sido estudiada.

## **JUSTIFICACIÓN**

La tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública en nuestro país a pesar de la aplicación masiva de la vacuna BCG y de los tratamientos farmacológicos disponibles. Uno de los factores involucrados en la morbilidad ha sido la aparición de cepas multi-farmacoresistentes. Estas causan enfermedad de difícil tratamiento en pacientes, debido a que a los que los fármacos de primera línea (H,R,Z,E) no resultan útiles y es necesario administrar fármacos de segunda línea.

En pacientes con TB MFR que reciben tratamiento con fármacos de segunda línea la evaluación de la respuesta al tratamiento es principalmente bacteriológica, sin embargo, la baciloscopía no es lo suficientemente sensible para detectar poblaciones escasas de bacilos una vez que se ha iniciado el tratamiento. Por otro lado, puede detectar poblaciones de bacilos no viables dando una idea falsa de falla farmacológica; por ello el cultivo es la mejor forma de evaluar la respuesta al tratamiento pero los resultados tardan semanas, lo que repercute en pérdida de tiempo para tomar decisiones terapéuticas alternativas.

Hasta el momento no hay ningún estudio que haya utilizado una estrategia alternativa para monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes con TB MFR y no se cuenta con un marcador subrogado que pueda predecir y determinar éxito o fracaso terapéutico a corto plazo en estos pacientes. Lo anterior plantea la necesidad de crear una línea de investigación en esta materia considerando que una determinación temprana del éxito o fracaso en el tratamiento conduciría a realizar las modificaciones terapéuticas necesarias para elevar las tasas de curación.

En este proyecto se propone utilizar la técnica de ELISpot para cuantificar células que producen IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno micobacteriano: ESAT-6 y a PPD como una medida de la carga bacteriana y por lo tanto como una herramienta alternativa y más eficaz que la baciloscopía para evaluar la eficacia del tratamiento anti-tuberculosis en casos de TB MFR. Finalmente disponer de un método que detecte el éxito o fracaso terapéutico temprano puede contribuir también en la evaluación de la eficacia de nuevas estrategias como nuevos fármacos anti-tuberculosis o esquemas de tratamiento más cortos.

## **HIPÓTESIS**

La evaluación de la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  medida a través de la técnica ELISpot es útil como marcador de respuesta al tratamiento efectivo de la tuberculosis MFR.

## **OBJETIVOS**

Evaluar la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  utilizando la técnica ELISPOT, en respuesta a la estimulación *in vitro* con ESAT-6 en pacientes con TB MFR durante el tratamiento anti-tuberculosis con fármacos de segunda línea.

## **PRINCIPALES O PRIMARIOS**

1. Evaluar la asociación de la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación *in vitro* con ESAT-6 con los resultados de baciloscopía y cultivo.
2. Establecer la utilidad del ELISpot como marcador de seguimiento de la eficacia del tratamiento en pacientes con tuberculosis fármaco sensible y con tuberculosis MFR en tratamiento con fármacos de segunda línea.

## **MÉTODOS**

Grupo de estudio:

1. Pacientes con TB MFR confirmada bacteriológicamente (resistencia por lo menos a isoniacida y rifampicina)
2. Pacientes con TB FS confirmada bacteriológicamente (susceptible a todos los fármacos)

## **UNIVERSO DE ESTUDIO:**

1. Pacientes que acudan o sean referidos a la clínica de tuberculosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias que cuenten con expediente clínico, que sean atendidos en la consulta externa o en las áreas de hospitalización y den su consentimiento voluntario para participar en el estudio.
2. Los casos serán clasificados por personal de la clínica de tuberculosis.
3. Los enfermos serán captados de manera prospectiva.

## **CRITERIOS DE INCLUSION:**

1. Tuberculosis activa Fármaco sensible: pacientes con tuberculosis confirmada bacteriológicamente con baciloscopía y cultivo para MTB en cuyas pruebas de susceptibilidad no exista resistencia a mas de un fármaco de primera línea (H,R,E,S).

2. Tuberculosis activa Multifarmaco-resistente: pacientes con tuberculosis confirmada bacteriológicamente con cultivo con desarrollo de MTB en cuyas pruebas de susceptibilidad exista resistencia a por lo menos H y R.
3. Ambos grupos de pacientes recibirán tratamiento bajo la estrategia TAES.
4. Hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 60 años.
5. Prueba de VIH por ELISA negativo.
6. Pacientes cuyo lugar de residencia les permita acudir mensualmente a las evaluaciones.
7. Pacientes con consentimiento informado (Anexo 2).

#### **CRITERIOS DE EXCLUSION.**

1. Pacientes con contraindicación médica para recibir tratamiento con cualquiera de los fármacos anti-tuberculosis (insuficiencia hepática, insuficiencia renal, alergia conocida a algún fármaco anti-tuberculosis).
2. Mujeres embarazadas.
3. Pacientes con alcoholismo o adictos a algún tipo de droga.
4. Indigentes.
5. Pacientes que por su co-morbilidad o complicaciones relacionadas a la tuberculosis su expectativa de vida no sea mayor a un año.
6. Karnofsky menor al 60%.

7. Pacientes que ya se encuentren en tratamiento anti-tuberculosis

## **CRITERIOS DE ELIMINACION**

1. Pérdida de seguimiento, abandono o muerte en cualquiera de las fases del estudio.

## **PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN**

### **Evaluación clínica:**

Se realizó la evaluación clínica y nutricional al inicio del tratamiento y se dio seguimiento de manera mensual con estudios de laboratorio y rayos X de tórax en ambos grupos de pacientes.

Los desenlaces clínico-bacteriológicos se clasificaron de acuerdo a las normas de la Organización Mundial de la Salud y la Norma oficial Mexicana para el control y tratamiento de la tuberculosis. (30)

- **Curación:** Paciente que completó el esquema de tratamiento y tiene por lo menos 5 cultivos negativos consecutivos con 30 días de diferencia entre cada uno. Si se reporta un cultivo positivo, pero no hay evidencia clínica de actividad se considera curado siempre y cuando este cultivo positivo esté precedido de otros 3 cultivos negativos con 30 días de diferencia entre cada uno.

- **Tratamiento concluido:** Paciente que cumplió el tratamiento establecido de acuerdo al programa, pero no cumple criterio de curación por no contar con resultados bacteriológicos.
- **Fracaso:** Si a pesar de estar recibiendo tratamiento tiene 2 o mas cultivos positivos de los últimos 5 cultivos realizados durante los últimos 12 meses de tratamiento o si cualquiera de los últimos 3 cultivos son positivos. También se considera como fracaso si se decide suspender el tratamiento por decisión clínica por otra razón clínica como efectos adversos.
- **Abandono:** Paciente que suspende el tratamiento por 2 o más meses consecutivos por cualquier razón.
- **Recaída:** Pacientes con baciloscopías y/o cultivo positivo posterior a haber sido declarado como curación.

### **Evaluación bacteriológica:**

Se recolectaron tres muestras de esputo obtenidas de forma espontánea antes de iniciar el tratamiento antituberculosis (día 0), a los 3, 6, 12, 15 y 18 meses de seguimiento en los pacientes con TB MFR. Para los pacientes con TB FS se tomaron muestras de esputo al inicio del tratamiento a los 2 y 6 meses respectivamente. Todos los cultivos se identificaron y confirmaron por procedimientos estándares y métodos cuantitativos.

## **Evaluación inmunológica**

Se obtuvo una muestra de sangre (30 ml) por flebotomía antes del inicio de tratamiento antituberculosis, a los 3, 6, 12, 15 y 18 meses en el caso de los pacientes con TB MFR. Para los pacientes con TB FS se tomarán muestras de sangre al inicio, 2 y 6 meses.

Las células mononucleares de sangre periférica (*PBMC, peripheral blood mononuclear cells*) se obtuvieron por centrifugación sobre Ficoll-paque y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI complementado con 2% de suero humano.

## **Antígenos**

El PPD y la proteína ESAT-6 se obtuvieron del laboratorio Statens Serum institute, Copenhagen, Denmark. El mitogeno PHA (Sigma, St. Louis, MO) se utilizó como control positivo. La técnica de ELISpot se realizó como previamente ha sido reportado por nuestro grupo. Brevemente, en placas de 96-pozos ImmunoSpot (Millipore, Bedford MA) se sensibilizaron con anticuerpos anti IFN- $\gamma$  durante toda la noche a 4<sup>0</sup>C, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando tres veces con PBS. Los PBMC se adicionaron a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pozo y se incubaron a 37°C por 16 a 24 horas en la presencia de los antígenos micobacterianos (ESAT-6 y PPD). La producción antígeno-específico de IFN- $\gamma$  se capturó en la vecindad de la célula. Las células se eliminaron y las citocinas se detectaron después de la adición de anticuerpos biotinados seguido de la adición de peroxidasa conjugada con estreptoavidina (Dako, Glostrup, Denmark) y el cromógeno al 1% 3-amino-9-ethylcarbazole (Pierce, Rockford, IL). De esta forma se

visualizaron pequeños puntos (spots) que corresponden a la citocina liberada por cada una de las células.

### **Análisis de la técnica de ELISPOT**

La frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  en cada pozo se determinó usando el equipo ImmunoSpot Image Analyzer (software versión 3.2, Cellular Technology Ltd). El promedio de los puntos (*spots*) en los pozos por duplicado se calculó y los resultados se reportaron en unidades formadoras de *spots* (UFS)/  $2 \times 10^5$  células. El número de spots que se observaron en los pozos en ausencia de los estímulos específicos se determinó como la producción constitutiva de IFN- $\gamma$  y se sustrajo de los pozos con los estímulos específicos. Se consideró como resultado positivo a un valor mayor a 10 UFS/ $2 \times 10^5$  células.

## **RESULTADOS**

### **Evaluación clínica y bacteriológica.**

Dentro del período del 2005 al 2006 se incluyeron 25 pacientes con tuberculosis pulmonar, 15 con tuberculosis MFR y 10 con tuberculosis FS, de los cuales 9 abandonaron el estudio (7 con TBFS y 2 con TB MFR) y 1 paciente falleció durante el seguimiento.

Se incluyeron dentro del estudio 11 pacientes con TB MFR, 5 varones (45.5%) y 6 mujeres (54.5%) con una mediana de edad de 50 años (25-69) en ambos grupos (Tabla 5). El 82% (9 pacientes) tenían antecedente de Diabetes Mellitus tipo 2, con un promedio de tiempo de evolución de 11 años Tabla 5. Todos los pacientes fueron incluidos en un programa de tratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea durante 18 meses, en promedio se administraron 82 dosis de fármaco parenteral y solo se suspendió de manera temprana en 2 pacientes por presentar nefrotoxicidad.

Los cultivos para MTB de muestras de esputo fueron negativas a los 6 meses, en 9 de 10 pacientes, en 10 de 11 cultivos a los 12 meses y a los 18 meses de seguimiento 7 de los 11 pacientes cumplieron con los criterios de curación, es decir 5 cultivos negativos durante el último año de tratamiento, 3 pacientes fueron catalogados como término de tratamiento (sin contar con evidencia bacteriológica de curación) y hubo 1 paciente con fracaso al tratamiento cuyos cultivos permanecieron positivos durante todo el seguimiento.

**Tabla 5.** Características clínicas de los pacientes con TB MFR y TBFS

<b>CARACTERISTICAS</b>		<b>n=11</b>	<b>n=4</b>
<b>GENERO</b>	Hombres	5 (45.5%)	3
	Mujeres	6 (54.5%)	1
<b>EDAD (Mediana)</b>	Hombres	50 (25-63)	48 (25-
	Mujeres	50 (35-69)	50)
			42
<b>DM2</b>	Hombres	4 (36.3%)	2
	Mujeres	5 (45.4%)	1
<b>VIH</b>	NEGATIVO	8	3
	NO REALIZADO	3	1
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>		23.3	
<b>Hemoglobina</b>		12.8	
<b>Linfocitos</b>		1.6	
<b>Albumina</b>		3.85	
<b>Glucosa (mg/dL)</b>		152.7	
<b>Colesterol</b>		157.4	

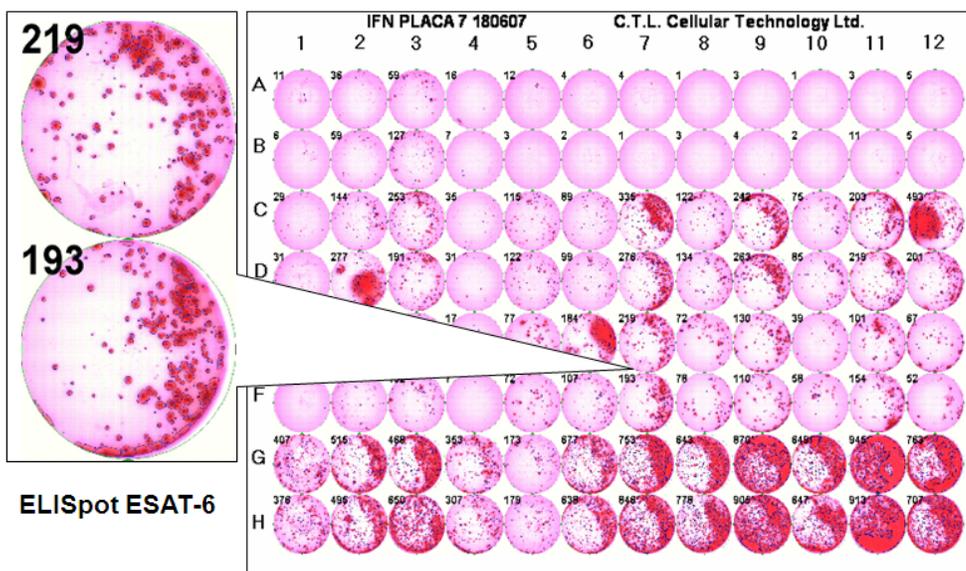
De los 4 pacientes con TB FS, la mediana de edad fue 45 (25-50) años, (Tabla 5). Todos los pacientes fueron incluidos en un programa de tratamiento de primera línea

(2H,R,E,Z; 6H,R). Todos los pacientes tuvieron baciloscopia y cultivo para MTB negativos al término del tratamiento y fueron declarados como curados.

La evaluación radiológica mostró que el 100% de los pacientes incluidos presenta enfermedad extensa definida por la presencia de lesiones en más de 2 segmentos pulmonares, y en todos los pacientes se encontró la presencia de enfermedad cavitada.

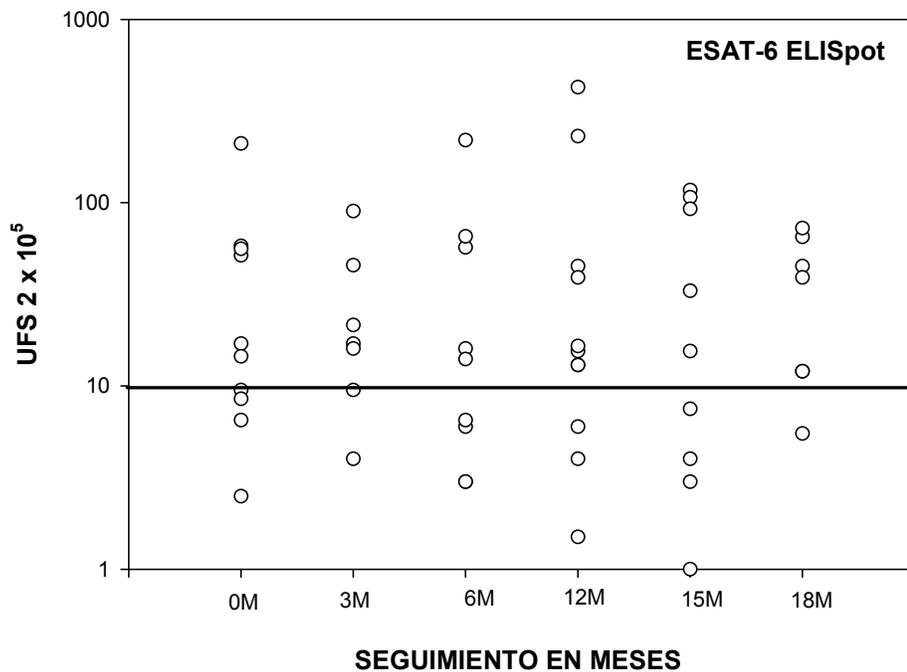
### Evaluación Inmunológica (producción de IFN- $\gamma$ por la técnica ELISpot)

Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes con TB MFR y TB FS durante el tratamiento con fármacos de primera y segunda línea. Del grupo de pacientes con TB MFR, en 11 de 11 pacientes al inicio del tratamiento, en 10 de 11 a los 3 meses, en 11 de 11 a los 6 y 12 meses , en 9 de 11 a 15 meses y en 8 de 11 a los 18 meses. En los 4 pacientes con TB FS, se obtuvieron las muestras a los 2 y 6 meses de tratamiento.



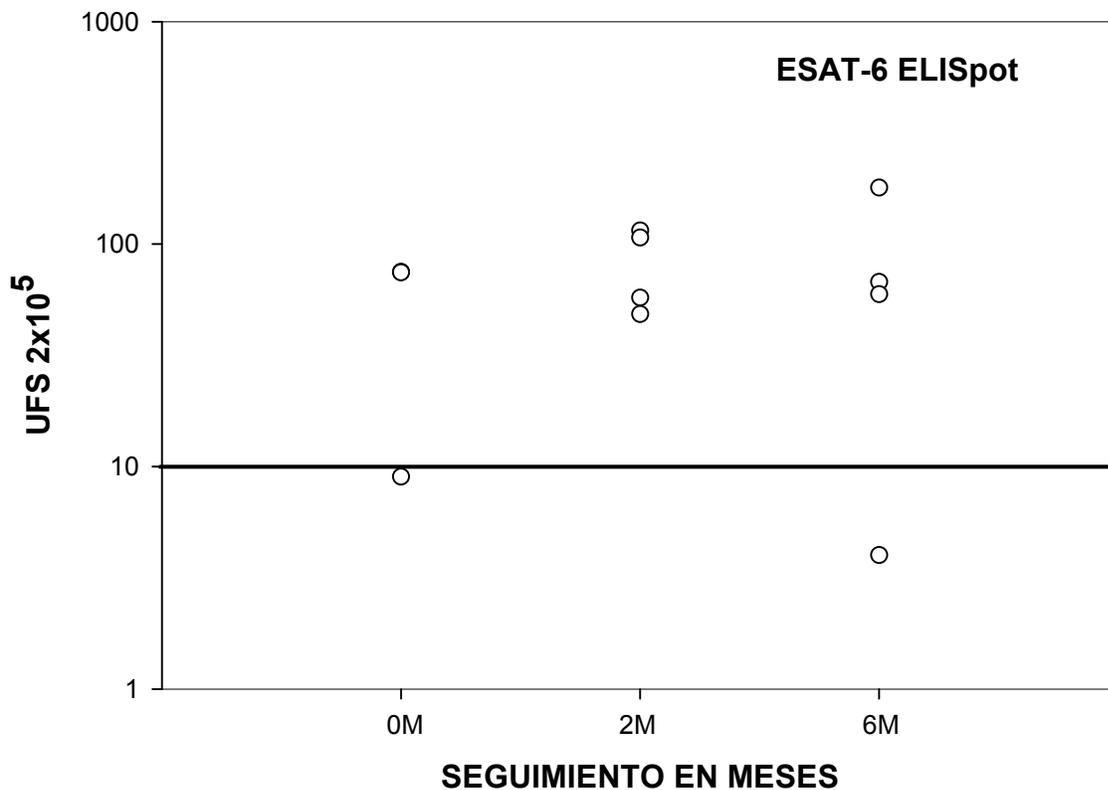
**Figura 5.** Imagen representativa de una placa de ELISpot para la determinación de IFN-  $\gamma$ . Los valores indican el número de UFS por pozo analizados con el ImmunoSpot Image Analyzer (software versión 3.2, Cellular Technology Ltd). La ampliación muestra la respuesta a la estimulación con ESAT-6.

La frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a ESAT-6 determinados por la técnica de ELISpot al inicio del tratamiento fue positiva (>10 UFS) en 6 de 11 pacientes, con una mediana de 53.75 UFS (14.5-210). A los 3, 6 y 12 meses de tratamiento, 5, 5 y 8 de 11 muestras fueron positivas, con una mediana de 21.5 UFS (16-90), 57 UFS (14-219) y 27.75 UFS (13-427) respectivamente. A los 15 meses 5 de 9 muestras fueron positivas con una mediana de 92.5 UFS (15.5-117) y a los 18 meses 6 de 8 muestras fueron positivas con una mediana de 42 UFS (12-72.5). (Figura 6)



**Figura 6.** Frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  por la técnica de ELISpot. La grafica muestra los valores de las unidades formadoras de spots (UFS) en respuesta al antígeno ESAT-6 durante los 18 meses de seguimiento en pacientes con TB MFR. Los valores fueron comparados por la prueba de MR ANOVA on ranks con el paquete estadístico Sigma Plot 3.5 (SPSS).

En los pacientes con TB FS la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a ESAT-6 fue positiva, al inicio del tratamiento en 2 de 3 pacientes , al término de la fase intensiva (2 meses) en 4 de 4 y al término del tratamiento (6 meses) en 3 de 4 muestras con una mediana de 74.75 UFS (74.5-75), 82.25 UFS (48.5-115) y 67.5 UFS (59.5-179.5) respectivamente (Figura 7).

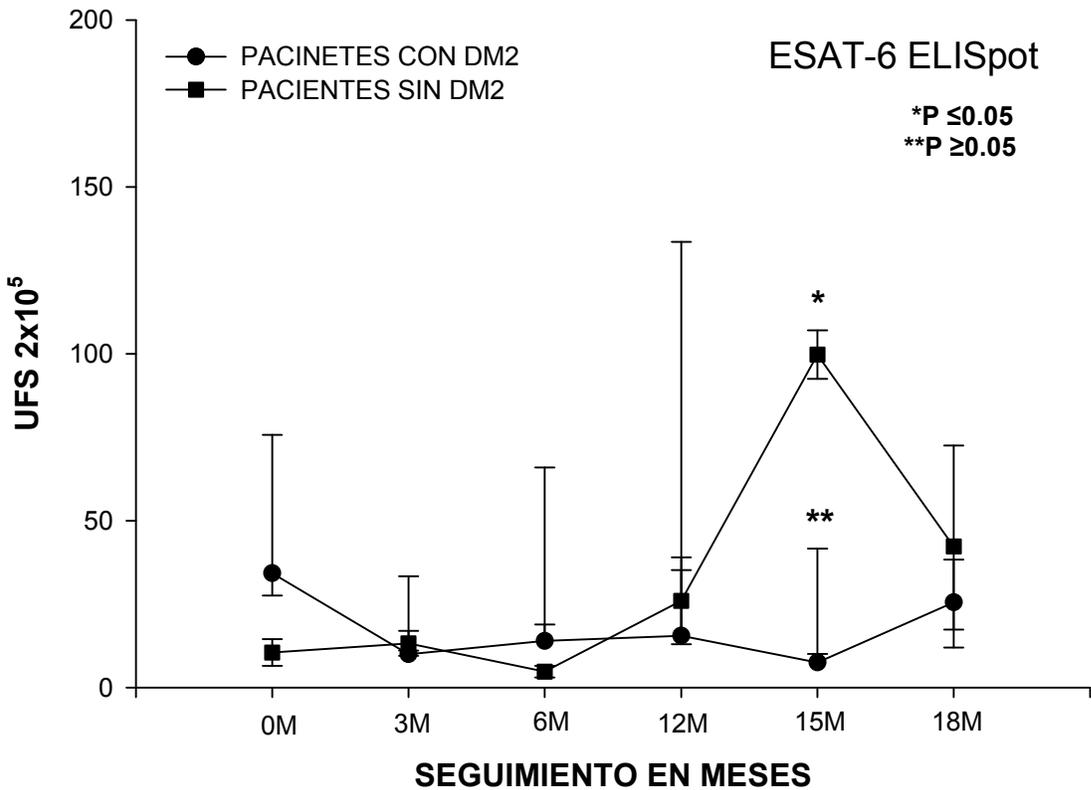


**Figura 7.** Frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  por ELISpot. La grafica muestra los valores unidades formadores de spots (UFS) en respuesta a ESAT-6 durante los 6 meses de tratamiento con fármacos de primera línea en pacientes con TB FS. Los valores fueron comparados por la prueba de MR ANOVA on ranks con el paquete estadístico Sigma Plot 3.5 (SPSS).

## **Correlación entre el resultado de ELISpot y los cultivos de MTB**

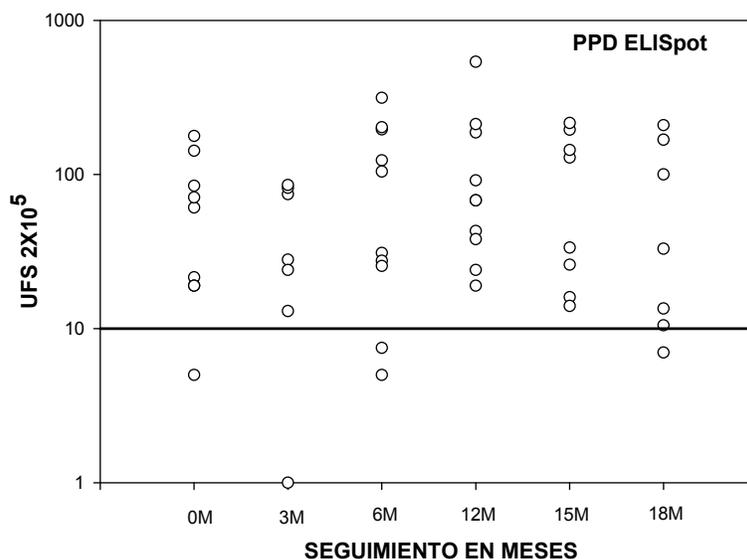
El “estándar de oro” para el seguimiento de los pacientes con TB MFR es el cultivo, sin embargo por las características de lento crecimiento del bacilo este método es muy tardado, por lo que se han introducido otros métodos inmunológicos como el Elisopt para poder predecir de manera temprana la respuesta al tratamiento en este tipo de pacientes. Por esta razón en este estudio se desarrollo la técnica de ELISpot como un biomarcador alternativo a los métodos microbiológicos. Al comparar los resultados de ELISpot al inicio y durante el tratamiento con fármacos de segunda línea no se observó un patrón de respuesta en la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  por lo que no fue posible establecer una correlación con los resultados de los cultivos para MTB en los diferentes tiempos de seguimiento establecidos.

Debido al alto porcentaje de pacientes que además padecen diabetes (82%), se decidió dividir a los pacientes con TB en pacientes con TB-DM2 y TB sin DM2. En la figura 8, se muestran los resultados de la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con el antígeno ESAT-6 durante el tratamiento antituberculosis en pacientes con TB con y sin DM2. Estos resultados muestran que en los pacientes sin DM2 se incrementa la producción de esta citocina a los 15 meses de tratamiento ( $P=0.023$ ). En contraste en los pacientes con DM2 no se observó un incremento significativo durante los 18 meses de seguimiento ( $P=0.573$ ).

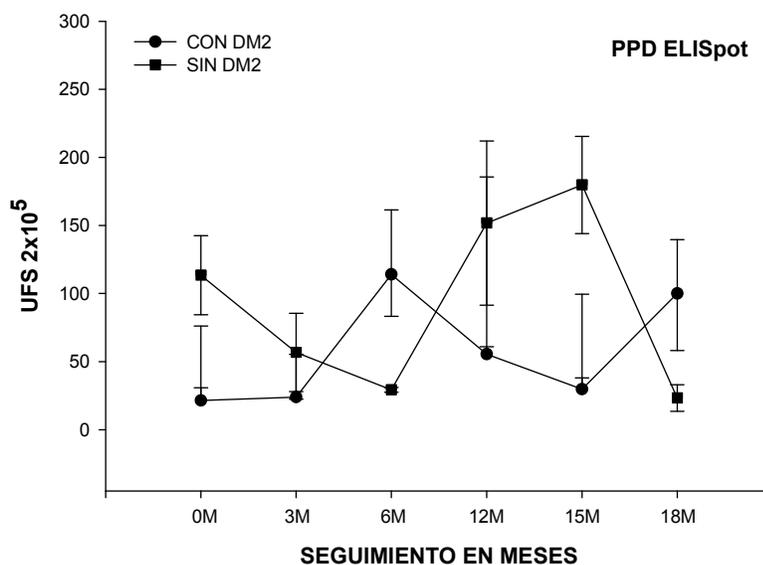


**Figura 8.** Frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  por ELISpot en pacientes con TB MFR con y sin DM2. Las graficas muestran los valores de las UFS en pacientes con y sin DM2 durante el seguimiento del tratamiento antituberculosis a los 18 meses. Los valores fueron comparados por la prueba de Wilcoxon Signed Rank Test con el paquete estadístico Sigma Plot 3.5 (SPSS).

Por otro lado, la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno PPD (Figura 9) se observa un cambio en las UFS durante el seguimiento del tratamiento con fármacos de segunda línea en pacientes con TB MFR, sin embargo, el cambio de las UFS no mostró un patrón de respuesta que permita establecer una correlación con la eficacia del tratamiento antituberculosis. De forma similar, no se observó un patrón de respuesta a la estimulación con PPD al comparar las UFS de los pacientes con y sin DM2 (Figura 10).



**Figura 9.** Frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a PPD a 18 meses de seguimiento en pacientes con TB MFR. (UFS=unidades formadores de spots). Los valores fueron comparados por la prueba de MR ANOVA on ranks con el paquete estadístico Sigma Plot 3.5 (SPSS).



**Figura 10** Frecuencia de las células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a PPD por la técnica de ELISpot. La grafica muestra la medianas de UFS en pacientes con TB MFR con y sin DM2 durante el seguimiento del tratamiento antituberculosis. Los valores

fueron comparados por la prueba de Wilcoxon Signed Rank Test con el paquete estadístico Sigma Plot 3.5 (SPSS).

En cuanto a los pacientes con TB FS, en este grupo de estudio se observó un incremento de los niveles de IFN- $\gamma$  en 3 de 4 pacientes, durante el tratamiento antituberculosis, mientras que, en un solo caso hubo reducción de las UFS. Estos resultados muestran que no existe una correlación de los valores de UFS con el resultado del cultivo para MTB. (Figura 7)

## **DISCUSION**

Los pacientes con TB MFR representan un reto en la práctica médica, son pacientes con una enfermedad crónica lentamente debilitante, progresiva, y con secuelas a largo plazo por la gran destrucción pulmonar que habitualmente presentan estos pacientes. En el tratamiento de este tipo de tuberculosis se utilizan fármacos de segunda línea cuya utilidad y eficacia no está bien establecido, es un tratamiento costoso, largo, con múltiples efectos adversos, con poca adherencia por parte de los pacientes y requiere del uso de fármacos parenterales.

Los pacientes con TB MFR en tratamiento, requieren de un seguimiento estrecho por parte del personal médico para monitorizar la eficacia del mismo, ya que el exponer al paciente a fármacos con poca utilidad se puede inducir un efecto amplificador de la selección de cepas resistentes.

El cultivo de MTB es el método microbiológico más usado para evaluar la eficacia del tratamiento antituberculosis en pacientes con TB MFR. En el presente estudio se utilizo el cultivo de MTB como “estándar de oro” y los resultados del cultivo se compararon con los resultados de la técnica de ELISpot. Durante el seguimiento microbiológico de estos pacientes se observo un cambio en el resultado de los cultivos a partir del sexto mes de tratamiento, 7 de 11 pacientes cumplieron con criterios de curación (5 cultivos negativos de forma consecutiva durante los últimos 12 meses de tratamiento) y en 3 pacientes se determinó como tratamiento concluido sin evidencia clínica ni radiológica de infección activa, no se pudo obtener muestras para cultivo por lo que no existe

evidencia bacteriológica de curación. En un solo paciente hubo fracaso al tratamiento cuyos cultivos se mantuvieron positivos durante todo el seguimiento.

Nuestros resultados mostraron que no existe un patrón específico en la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  durante el seguimiento de los pacientes con TB MFR que nos permita determinar la eficacia o falla del tratamiento. Los datos encontrados en este estudio contrastan con lo descrito previamente por Carrara y cols. y Aiken y cols. (28,29) quienes realizaron estudios de seguimiento en pacientes con tratamiento antituberculosis utilizando fármacos de primera línea, encontrando un patrón de eficacia del tratamiento por el descenso e incluso negativización de las UFS (<10 UFS) al término del tratamiento antituberculosis, demostrando de esta manera la utilidad que podría tener esta técnica para el seguimiento de la TB FS.

Es importante hacer mención que en el presente estudio por primera vez se incluyeron pacientes con TB MFR, a diferencia de los grupos estudiados con anterioridad, por lo tanto es importante puntualizar las diferencias en cuanto a las características de virulencia del bacilo tuberculoso con fármaco resistencia. En estudios en animales se ha encontrado que las cepas de MTB con multifarmaco-resistencia son bacilos de menor virulencia, con características de crecimiento y patogenicidad diferentes a las cepas fármaco sensibles y con menor capacidad de diseminación hematógica. (31)

Es posible que debido a estas características los resultados obtenidos en este estudio de pacientes con TB MFR no sean similares a los obtenidos en estudios previos realizados en pacientes con TB FS y con bacilos con alta capacidad de replicación, diseminación y de virulencia.

La proteína ESAT 6 es un marcador de virulencia del bacilo, tiene un papel importante en la supervivencia y multiplicación de MTB. (32,33) Es por esto que posiblemente la proteína ESAT 6 no es el antígeno ideal para el seguimiento de los pacientes con TB MFR, debido a las características propias del bacilo. Por esta razón es posible que el uso de antígenos micobacterianos expresados durante la latencia puedan tener mayor utilidad por lo que estudios con antígenos de este tipo deberán ser analizados en el futuro.

La persistencia de positividad de las UFS a la estimulación con ESAT-6 una vez concluido el tratamiento antituberculosis se puede atribuir al hecho de que los pacientes con una vez completado el tratamiento antituberculosis exista una reactivación de la respuesta inmune periférica (34). Estos resultados podrían ser semejantes a lo observado por nuestro grupo, donde se demostró que en los pacientes con tuberculosis en tratamiento con fármacos antituberculosis, se incrementa la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno de 85kDa de MTB (35)

Se ha propuesto en estudios previos, que en aquellos pacientes en los que persisten niveles elevados de las células T productoras de IFN- $\gamma$  o no negativizaron, es probablemente que exista una re-exposición a MTB, hecho que podría ser factible en países con alta prevalencia de TB como México, donde además, es posible la exposición a micobacterias ambientales (36).

De acuerdo a la evaluación radiológica al inicio del tratamiento todos los pacientes incluidos presentaron enfermedad extensa y cavitada. Esto sugiere que la carga bacilar de estos pacientes es alta y posiblemente un mayor número de antígenos son liberados

durante la muerte bacteriana y mantienen la población de células T productoras de IFN- $\gamma$ . Por esta razón, tenemos la hipótesis de que en este tipo de pacientes probablemente sea necesario realizar el seguimiento a un mayor tiempo en base a un estudio realizado en pacientes con TB FS en quienes se observa un cambio en las UFS a 12 meses de seguimiento. (29).

Es posible observar valores bajos de UFS en los pacientes con DM2 (Figura 8) mientras que en los pacientes sin DM2 se observa un incremento significativo de los valores de UFS hacia el 15to mes de tratamiento con un posterior descenso. Estos resultados pueden deberse a la alteración de la respuesta inmune en los pacientes con DM2.

Por último, cabe señalar que la principal limitación del estudio fue el número de pacientes incluidos por la dificultad del seguimiento de los pacientes por tiempos prolongados (el estudio duro 18 meses). Otra limitante fue que no siempre se logro obtener muestras útiles para el cultivo de MTB, las cuales son necesarias para la comparación con los resultados obtenidos por el ELISpot.

## **CONCLUSIONES**

Por primera vez, se realiza un estudio para evaluar la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$ , mediante la técnica de ELISpot, para determinar la eficacia del tratamiento antituberculosis en pacientes con TB MFR.

Los resultados demuestran que el tratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea tiene una gran tasa de éxito, ya que de los 11 pacientes incluidos, 7 cumplieron con criterios de curación y 3 concluyeron tratamiento de manera exitosa, sin evidencia clínica ni radiológica de infección activa.

Nuestros resultados mostraron que la técnica de ELISpot no es útil en el seguimiento de pacientes con TB MFR, los valores de UFS fueron heterogéneos y no se observó un patrón específico que correlacionara con la eficacia o falla del tratamiento.

Los valores de las UFS se mantienen bajos durante el tratamiento antituberculosis en los pacientes con TB y DM2, Mientras que en los pacientes con TB sin DM2 se observó un incremento al 15° mes.

Finalmente, de acuerdo a nuestros resultados el cultivo para MTB sigue siendo la prueba de mayor utilidad para el seguimiento del tratamiento antituberculosis en pacientes con TB MFR.

## REFERENCIAS.

1. World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report 2008
2. World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. 2008
3. Wing Wai YEW, Chi Chiu Leung. Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007. *Respirology* 2008;13: 21–46
4. JoAnne L. Flynn, John Chan. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:93–129
5. Reinout van Crevel, Tom H. M. Ottenhoff, Jos W. M. van der Meer. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, Apr. 2002; 15(2): 294–309.
6. J. A. Armstrong and P. D'Arcy Hart. Response of cultured Macrophages to *Mycobacterium Tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *Exp Med.* 1971 September 1; 134(3): 713–740.
7. J . A. Armstrong, P . D'arcy Hart. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med.* 1975 July 1; 142(1): 1–16
8. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in

Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton ATP-ase. *Science* 1994;Feb 4; 263 (5147): 678-81

9. Chan J, Fujiwara T, Brennen P, Mc-Neil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR. 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2453–57
10. Chan J, Fan X-D, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. 1991. Lipoarabinomannan a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.*59:1755–61
11. Adams L, Dinauer MC, Morgenstern DE, Krahenbuhl JL. 1997. Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. *Tuberculosis Lung Dis.* 78:237–56
12. W.H. Boom, David H. Canaday, Scott A. Fulton, Adam J. Gehring, Roxana E. Rojas, Marta Torres. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis* (2003) 83, 98–106
13. Naomi Bock and Lee B. Reichman. *Tuberculosis and HIV/AIDS: Epidemiological and Clinical Aspects (World Perspective)* N Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 2004; 25 (3): 337-44
14. Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.*1999; 17:297–329
15. Alamelu Raja. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120, October 2004, pp 213-232

16. Kamlesh Bhatt, and Padmini Salgame. Host Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Immunology*, 2007; 27(4):347-62.
17. Sodhi A, Gong J, Silva C, Qian D, Barnes PF. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1997; 25 : 617-20.
18. Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel, and M. M. Braun. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345:1098–1104.
19. Prabha C, Kripa V J, Ram Prasad M, Sulochana D. Role of TNF-a in host immune response in tuberculous pleuritis. *Curr Sci* 2003; 85 : 639-42.
20. Caminero Luna Jose A. Guía de ka Tuberculosis para medicos especialistas. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y enfermedades respiratorias (UICTER) 2003
21. Philip LoBue. Extensively drug-resistant tuberculosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2009, 22:167–173
22. Edward D. Chan and Michael D. Iseman. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2008, 21:587–595
23. Reuben M. Granich, Susana Balandrano, Adalberto J. Santaella, Nancy J. Binkin, Kenneth G. Castro, Alma Marquez-Fiol y cols. Survey of Drug Resistance of Mycobacterium tuberculosis in 3 Mexican States, 1997. *Arch. Intern Med* 2000;160:639–644.

24. Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT). guías latinoamericanas de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis fármacorresistente.
25. J. A. Cascante, I. Pascal, V. M. Eguía, J. Hueto. Diagnosis of tuberculosis infection. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2007; 30 (Supl. 2): 49-65.
26. Ajit Lalvani . Diagnosing Tuberculosis Infection in the 21st Century: New Tools To Tackle an Old Enemy. *Chest* 2007;131;1898-1906
27. Ansar A. Pathan, Katalin A. Wilkinson, Paul Klenerman, Helen McShane, Robert N. Davidson, Geoffrey Pasvol, Adrian V. S. Hill, and Ajit Lalvani. Direct Ex Vivo Analysis of Antigen-Specific IFN- $\gamma$ -Secreting CD4 T Cells in Mycobacterium tuberculosis-Infected Individuals: Associations with Clinical Disease State and Effect of Treatment. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 5217–5225.
28. Stefania Carrara, Donatella Vincenti, Nicola Petrosillo, Massimo Amicosante, Enrico Girardi and Delia Goletti. Use of a T Cell–Based Assay for Monitoring Efficacy of Antituberculosis Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38:754–6.
29. Alexander M Aiken, Philip C Hill, Annette Fox, Keith PWJ McAdam, Dolly Jackson-Sillah, Moses D Lugos, Simon A Donkor, Richard A Adegbola, and Roger H Brookes. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:66
30. World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. 2006
31. Gopinath S. Palanisamy, Nancy DuTeau, Kathleen D. Eisenach, Donald M. Cave, Susan A. Theus, Barry N. Kreiswirth, Randall J. Basaraba, Ian M. Orme.

32. Clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* display a wide range of virulence in guinea pigs. *Tuberculosis* 2009; 89: 203–209
33. Priscille Brodin, Ida Rosenkrands, Peter Andersen, Stewart T. Cole and Roland Brosch. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors?. *Trends in Microbiology*. November 2004; 12 (11): 500-08
34. Betty A. Wu-Hsieh, Chung-Kwang Chen, Jer-Hwa Chang, Show-Yun Lai, C. H. Herbert Wu, Wern-Cherng Cheng, Peter Andersen, and T. Mark Doherty. Long-Lived Immune Response to Early Secretory Antigenic Target 6 in Individuals Who Had Recovered from Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 33:1336–40
35. Stephan K. Schwander, Martha Torres, Claudia Carranza C, Dante Escobedo, Magdalena Tary-Lehmann, Peter Anderson, Zahra Toossi, Jerrold J. Ellner, Elizabeth A. Rich, and Eduardo Sada. Pulmonary Mononuclear Cell Responses to Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in Healthy Household Contacts of Patients with Active Tuberculosis and Healthy Controls from the Community. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 1479–1485.
36. J.O. Falkinham. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology* 107 (2009) 356–367





## ANEXO 2: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**ESTUDIO: ESTUDIO DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS  
MULTIFARMACO RESISTENTE: EVALUACIÓN DE INTERFERÓN  $\gamma$   
TNF- $\alpha$  E INTERLEUCINA 10 COMO RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

### PACIENTES CON TUBERCULOSIS

INSTITUTO NACIONAL  
DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS

JUN 2005

COMITÉ DE CIENCIA  
Y BIOÉTICA

#### **Carta de consentimiento**

##### **PROPOSITO DEL ESTUDIO**

A usted le han informado que tiene una enfermedad pulmonar llamada tuberculosis (TB). La TB es una enfermedad infecciosa, ocasionada por la bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*. Las personas con TB pulmonar frecuentemente tosen, presentan baja de peso, calentura y sudoración nocturna. La TB pulmonar es una enfermedad común en México que afecta a mujeres, hombres y niños. La TB se transmite a través de gotitas de saliva de pacientes con TB. Las personas en contacto con pacientes con TB pulmonar pueden respirar la bacteria de las gotas de saliva y enfermarse. Así mismo existe una forma de tuberculosis resistente a los medicamentos convencionales por lo que es necesario utilizar medicamentos especiales, que si bien son útiles son más tóxicos y más costosos. Esta forma de tuberculosis resistente puede ser curable, siempre y cuando el paciente reciba el medicamento adecuado durante el tiempo indicado. Por lo que es fundamental que se tenga la responsabilidad por parte del paciente de acudir a su unidad de salud y a sus citas en el INER para tomar su medicamento en la estrategia de Tratamiento estrictamente supervisado.

El propósito de nuestro estudio es desarrollar una técnica diagnóstica que nos permita evaluar la eficacia del tratamiento para la tuberculosis resistente, ya que hasta el momento, la única forma de saber si un paciente está respondiendo al tratamiento es por medio del cultivo, sin embargo los resultados se obtienen de manera muy tardada (por lo menos 3 a 4 semanas). Con esta técnica podríamos tener resultados de una manera más rápida.

En este proyecto se planea estudiar 120 voluntarios; 30 personas sanas, 30 contacto con pacientes con TB multifarmaco resistente, 30 pacientes con TB caso nuevo fármaco susceptible y 30 pacientes con TB fármaco resistente. Los resultados de este proyecto podrán ser útiles tanto para la selección de tratamiento terapéuticos eficaces y adecuados.

##### **CONSENTIMIENTO**

Esta forma de consentimiento fue hecha para informarle acerca del proyecto. Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, deberá proporcionar su aprobación por escrito. Usted recibirá una copia de su consentimiento. Su participación en este estudio es voluntaria y de ninguna forma afectará cualquier atención médica que usted o alguno de sus familiares requiere en este hospital. Si usted decide participar en este estudio, se le realizará una historia médica. También se harán estudios de laboratorio, incluyendo la prueba para el virus del SIDA y una radiografía de tórax.

##### **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

Solo podrán participar pacientes con diagnóstico reciente de TB que no presenten otra enfermedad como: asma, cáncer, o cualquier enfermedad pulmonar. No podrá participar si usted ha sido infectado por el virus del SIDA.

Alguno de los médicos que participan en este proyecto le aplicará una prueba en la piel que se conoce como PPD. En el laboratorio clínico de este hospital se le tomará una muestra de sangre para practicar estudios de rutina como; biometría hemática, química sanguínea. También se realizará la prueba de ELISA para detectar la presencia del virus del SIDA. En el caso que usted tiene el virus en su cuerpo, usted no podrá participar en el estudio. Se le proporcionará información sobre los lugares donde puede atenderse. Los resultados de las pruebas son secretos y solo serán usados para el estudio. Se le entregará una copia de los resultados.

Cuando el medico reciba los resultados del laboratorio, el le confirmara su participación en el estudio. Usted será citado para una toma de sangre y la obtención de muestras de esputo

De una de las venas de su brazo se le tomará una muestra de sangre de aproximadamente 40 ml. Antes de iniciar el tratamiento antituberculosis, cada dos semanas durante los tres primeros meses de tratamiento y posteriormente cada mes hasta terminar el tratamiento. Esta muestra se utilizará para estudiar la respuesta de células de sangre ante la infección con el germen que causa la TB.

Así mismo se tomaran muestras de expectoración para baciloscopia y cultivo (a los pacientes que estén en tratamiento por tuberculosis activa ya sea MFR o caso nuevo) de la siguiente manera: Cada dos semanas durante los primeros tres meses y mensualmente por el resto del tratamiento.

#### **RIESGOS**

Su participación en el estudio no implica un riesgo que ponga en peligro su actual estado de salud o su vida. Sin embargo, existe la posibilidad de riesgo. Los que pudieran presentarse son:

1. En el brazo donde se introdujo la aguja para obtener la muestra de sangre podría aparecer un moretón o sentir un pequeño dolor.

#### **BENEFICIOS**

Los resultados de este estudio no lo beneficiaran directamente. Sin embargo, los resultados que se obtengan del estudio de células obtenidas de voluntarios como usted, permitirán a los doctores de este estudio entender mejor la TB, así como su tratamiento y prevención.

#### **COSTOS**

Usted no pagara ninguno de los estudios que se le realizaran

#### **TRATAMIENTO**

Es importante que usted este enterado que no es necesario que participe en este estudio para recibir el tratamiento para la TB. El tratamiento antituberculoso es gratuito en este hospital. La administración del los medicamentos no se condiciona a su participación en el proyecto.

#### **CONFIDENCIALIDAD**

Es claro que su participación es voluntaria. Toda la información obtenida es estrictamente confidencial y para su uso en investigación.

Si usted tiene alguna duda o pregunta podrá comunicarse con la Dra. Martha Torres Rojas (teléfono 5666-6172 o 5666 4539 ext. 117), Dr. Rafael Valdez Vázquez (teléfono 56 66 45 39 Ext. 130) o el Dr. Guillermo Carvajal Sandoval, Presidente del Comité de Ciencia y Bioética (teléfonos 5666-4539 ext. 212 o 5665-0043) en el *Instituto de Enfermedades Respiratorias*, México DF.



\_\_\_\_\_ me ha descrito de forma sencilla y completa en que consiste el estudio. Me habló acerca de los riesgos y beneficios que acarrea mi participación en el estudio. Mi participación voluntaria comprende mi disposición a completar la información que se me pida. Yo entiendo que mi decisión de participación o no participar en este estudio, no altera la atención médica que yo o mis familiares recibamos en esta institución. Se me ha informado que los resultados que se generen de este estudio serán publicados en revistas científicas y mi identidad permanecerá anónima. Los resultados de esta investigación podrán ser supervisados por las instituciones que apoyan este estudio. Cualquier perjuicio o enfermedad que resultará como consecuencia del estudio será atendida en la institución donde se me realice el estudio.

Mi participación en este estudio no interfiere con mis derechos humanos.

Se me proporcionará una copia de esta forma para que yo la conserve.

\_\_\_\_\_  
Nombre (voluntario)

\_\_\_\_\_  
Firma (voluntario)

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre (testigo)

\_\_\_\_\_  
Firma (testigo)

\_\_\_\_\_  
Fecha

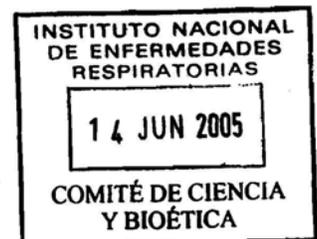
**ENTREVISTADOR/A**

Yo he explicado los propósitos de este estudio al voluntario. El voluntario entendió los propósitos de este estudio, así como los riesgos y beneficios que conlleva su participación voluntaria en el estudio.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Entrevistador

\_\_\_\_\_  
Firma del Entrevistador

\_\_\_\_\_  
Fecha



**CARTA DE CONSENTIMIENTO**

Yo entiendo los propósitos de este estudio. Entiendo perfectamente los riesgos y beneficios al participar en este estudio.

Mi participación en este estudio es libre y voluntaria. No me he sentido en ningún momento presionado para tomar la decisión de participar.

Entiendo que también me están solicitando mi autorización para conservar el material biológico, que se obtenga de mis células de sangre y del pulmón. Este material será usado en futuras investigaciones para completar los objetivos del proyecto.

\_\_\_\_\_ Doy mi autorización para conservar muestras procedentes de mi sangre y pulmón, para futuras investigaciones.

\_\_\_\_\_ No doy mi autorización para conservar muestras de sangre y pulmón, para futuras investigaciones.

Mi firma y/mi huella al calce de esta hoja son mi consentimiento para participar en este estudio.

\_\_\_\_\_  
Nombre (voluntario)

\_\_\_\_\_  
Firma o huella (voluntario)

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre (testigo)

\_\_\_\_\_  
Firma o huella (Testigo)

\_\_\_\_\_  
Fecha

**ENTREVISTADOR/A**

Yo he explicado los propósitos de este estudio al voluntario. El voluntario entendió los propósitos de este estudio, así como los riesgos y beneficios que conlleva su participación.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Entrevistador

\_\_\_\_\_  
Firma (Entrevistador)

\_\_\_\_\_  
Fecha

Versión 2

