



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

**ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA EN SANGRE TOTAL CONTRA
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN SUJETOS CON DIABETES
MELLITUS TIPO 2 COMO MARCADOR DE DISFUNCION INMUNOLOGICA**

PERIODO 2013-2014

**TESIS DE POSTGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALIDAD EN
INFECTOLOGÍA**

PRESENTA:

DR. PEDRO MARTÍNEZ AYALA

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO

CIUDAD DE MÉXICO, DF. JULIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. MARCO TEÓRICO
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. JUSTIFICACIÓN
5. HIPÓTESIS
6. OBJETIVOS DEL ESTUDIO
Generales
Específicos
7. MATERIAL Y MÉTODOS
8. RESULTADOS
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES
10. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, 9 millones desarrollan tuberculosis anualmente y 2 millones cada año mueren resultado de la infección (1).

Por otra parte la carga global de la diabetes mellitus está incrementando. La prevalencia actual se estima que es de 285 millones de casos y se calcula alcanzará los 438 millones de caso para el 2030. Un estimado del 70% de los adultos con DM habitan en países de tercer mundo y en vías de desarrollo y el mayor incremento en las tasas de DM2 se predice ocurrirá en los países en vías de desarrollo. La mayoría de estas regiones son también zonas de una carga elevada de tuberculosis (1).

2. MARCO TEORICO

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

La asociación entre diabetes mellitus y tuberculosis ha sido demostrada en varios estudios de cohorte y casos controles. Un meta-análisis de estudios de cohorte realizado en el 2008 mostró que la DM incrementa el riesgo de tuberculosis (RR 3.11, 95% IC 2.27-4.26). El riesgo medido a través de los estudios casos-controles ha sido muy heterogéneo con ORs entre 1.16-7.83. (2). Estudios de cohorte prospectiva más recientes, mejor diseñados considerando un mayor número de factores de riesgo para el desarrollo de tuberculosis, han mostrado un incremento en el riesgo y el cual es proporcional a la severidad de la DM (3).

De forma interesante, algunos estudios han reportado que la fuerza de la asociación entre tuberculosis y DM incrementa con la incidencia de tuberculosis en la población estudiada.

De hecho la incidencia de tuberculosis en el país de nacimiento es uno de los mayores predictores del riesgo de desarrollo de tuberculosis (4).

Por otra parte los estudios de cohorte en poblaciones de baja incidencia de tuberculosis como Australia y Dinamarca han encontrado un incremento modesto de desarrollar tuberculosis en pacientes que padecen DM (4, 5). Cuestionando de esta forma el escrutinio de tuberculosis latente de forma sistemática en esta población de pacientes.

DM Y TUBERCULOSIS EN HISPANOS

En México, se han hecho cálculos asumiendo un RR de 3 y una prevalencia de DM en México de 6%. Con lo anterior se concluiría que la DM estaría implicada en el 67% de los casos de TB activa en los individuos que padecen DM, y representaría el 11% de los casos en la población mexicana (6).

Otro estudio de casos y controles realizado en la frontera de nuestro país determinó un riesgo relativo mayor para el desarrollo de tuberculosis en individuos hispanos con DM comparado con blancos y negros (OR=2.95; 95% CI=2.61, 3.33 vs OR=1.31; 95% CI= 1.19, 1.45 y OR= 0.93; 95% IC=0.78, 1.09). En esa población de pacientes en los años 90's, se demostró que la DM triplicaba el riesgo de desarrollar tuberculosis en hispanos aún ajustando estado socioeconómico y el factor migratorio. El riesgo de tuberculosis atribuible a DM entre los hispanos de edad media fue de (25.2%), similar al atribuido a infección por VIH (25.5%). El riesgo de tuberculosis se correlacionó con la severidad de la DM. Además de forma interesante, el riesgo de tuberculosis en relación a DM complicada o pobremente controlada fue mayor en hispanos que en otros grupos raciales/étnicos. Por lo tanto el descontrol glucémico no explica de forma completa el riesgo para la tuberculosis en pacientes DM de diferentes grupos raciales. Un estudio reciente de una cohorte prospectiva realizado en el sureste Mexicano encontró una alta frecuencia de DM en pacientes con tuberculosis pulmonar (29.6%), similar a lo reportado en otras regiones en población México-Americana (7).

SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA A TB OCACIONADA POR LA DM

En una cohorte hispana de 2,500 pacientes que habitaban en la frontera de México/EUA con una tasa elevada de DM y tuberculosis, se encontró que cerca del 30% de los casos de tuberculosis eran atribuidos a DM. Con el objetivo de identificar la expresión de genes que predisponían a la tuberculosis, dieron seguimiento a 9 individuos (3 hombres y 6 mujeres), edad entre 32-74 años con una media de 57 años) desde la glucosa anormal en ayuno (Glucosa en ayuno 100-126 mg/dl) hasta el desarrollo de diabetes franca (Glucosa en ayuno >126 mg/dl). Se determinó la expresión génica de 312 genes recién identificados como la señal de transcripción en la tuberculosis. Únicamente 13 tuvieron

una significancia estadística ($P < 0.05$). Sólo dos genes HK2 y CD28 tuvieron una reducción estadísticamente significativa en los 9 participantes mientras desarrollaron DM.

El gen HK2 codifica a la hexocinasa 2 la cual es un factor crítico para la glucólisis aerobia. La glucólisis aeróbica es una fuente de energía única para los macrófagos. Por lo tanto la expresión reducida puede alterar la función de los macrófagos por lo tanto incrementar el riesgo de la tuberculosis (8).

El gen CD28 codifica al antígeno de la célula T CD28. La respuesta Th1 juega un papel clave en la activación de los macrófagos contra la tuberculosis. Por lo tanto la expresión reducida de CD28 en los pacientes con DM altera la activación de la célula T y la respuesta Th1 incrementando la susceptibilidad en contra de la tuberculosis.

Un estudio en una zona altamente endémica en África mostró que, a pesar de una elevada exposición a *M. tuberculosis*, 20% de la población expuesta permaneció con PPD negativos. En base a lo anterior se demostró en este estudio que la negatividad del PPD y la producción de INF-gama y TNF en respuesta a los antígenos de *M. tuberculosis* estuvieron bajo estricto control genético, lo cual sugiere una resistencia independiente de la célula T (9).

INMUNOLOGÍA y TUBERCULOSIS

La tuberculosis es el prototipo de infección que requiere una respuesta inmune celular para su control. La exposición a *Mycobacterium tuberculosis* puede resultar en diferentes desenlaces clínicos, los cuales incluyen la ausencia de cualquier infección clínica o laboratorial, infección sin enfermedad clínicamente activa y enfermedad activa. El estadio de la infección está determinado por la habilidad de la respuesta inmune adaptativa e innata para erradicar o controlar la infección por *M. tuberculosis*. Sólo algunos pacientes desarrollan signos inmunológicos de infección; otros pueden eliminar la bacteria durante la fase inmune innata, sin generar células T de memoria (prueba cutánea de la tuberculina y ensayo de liberación de interferón gamma con resultados negativos). En la fase inmune adaptativa, las células T son activadas por células presentadoras de antígeno y esto genera células de memoria (T mem) y efectoras (T efe). También se activan células B y anticuerpos específicos contra *M. tuberculosis*. La infección puede ser erradicada en esta etapa. Sin embargo, la mayoría de los individuos expuestos entrarán a la fase

quiescente, la cual puede persistir durante toda la vida. En esta fase, las micobacterias son contenidas dentro de los granulomas, los cuales consisten en un área central con macrófagos infectados rodeada por células T de memoria efectoras y células B. A pesar de que el huésped no erradica al organismo, se previene la replicación y la diseminación. Se requiere un balance óptimo entre la reacción proinflamatoria mediada por Células T (Th1) caracterizada por la producción de interferón gama, factor de necrosis tumoral e interleucina-12, además de la producción de interleucina 17 y la regulación de la inflamación excesiva mediada por respuestas de células T tipo Th2 asociadas con la producción de interleucina-4 y linfocitos T reguladores (Treg). La fase replicativa sintomática ocurre cuando la micobacteria escapa del control inmunológico, se rompe el granuloma y ocurre una reacción de fase aguda caracterizada por la producción de marcadores proinflamatorios. En estados de inmunosupresión, la forma más fácilmente ejemplificada es la infección por VIH, en la cual la depleción de CD4 dispara el mecanismo de escape inmunológico con la consecuente infección activa (10, 11).

RELACIÓN ENTRE DESCONTROL GLUCÉMICO Y TUBERCULOSIS.

Se ha demostrado en estudios experimentales in vivo que la hiperglucemia provoca varias alteraciones que predisponen al desarrollo de la infección por tuberculosis. Se ha demostrado en modelos de ratones diabéticos experimentalmente infectados con M. Tuberculosis que tienen cargas bacterianas mayores comparados con ratones euglucémicos, independientemente de la ruta de inoculación de M. Tuberculosis (12). Comparado con ratones euglucémicos, ratones diabéticos crónicos tienen una menor producción de interferón gama (IFN- γ) e interleucina-12 (IL-12), además de una menor respuesta de las células T frente a el antígeno de M. Tuberculosis (ESAT-6), evidenciando una marcada disminución de la actividad inmune adaptativa (Th1), la cual juega un rol crucial en el control de la infección por tuberculosis (12). Otro estudio demostró que los niveles de IFN- γ tuvieron una correlación negativa con los niveles de HbA1c (13). Se ha reportado además que los neutrófilos de las personas con DM tuvieron una quimiotaxis reducida y menor potencial bactericida que los controles no diabéticos (13). Lo anterior apoya fuertemente la hipótesis de que la DM directamente altera la inmunidad adaptativa e innata necesarias para contrarrestar la proliferación de M. Tuberculosis.

En el ámbito clínico la relación entre descontrol glucémico se ha demostrado también de forma consistente. Dos estudios han comparado la incidencia de tuberculosis activa entre

pacientes con DM dependientes de insulina y DM no dependientes de insulina. El primero de estos fue una cohorte de 1529 pacientes con DM en Chile, quienes fueron seguidos prospectivamente entre 1959 a 1982, la probabilidad a 10 años de desarrollar tuberculosis fue de 24% en diabetes insulino dependientes y 4.8% en aquellos que no utilizan insulina. Otro estudio prospectivo realizado en Tanzania con un seguimiento de 1 a 7 años, mostró que los pacientes con DM que usaban insulina el 9% desarrolló tuberculosis comparado con 2.7% de los pacientes con DM que no utilizaban insulina.

Finalmente un estudio de cohorte prospectiva recientemente publicado, realizado en el sureste de México, demostró una prevalencia elevada de diabetes mellitus en pacientes con tuberculosis pulmonar (29.63%), además los pacientes con diabetes que tenían tuberculosis tuvieron manifestaciones clínicas más severas, negativización más tardía de baciloscopías, mayor probabilidad de falla al tratamiento, recurrencia y recaída (14).

Tuberculosis latente y marcadores de riesgo de reactivación

Los pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP) son la principal fuente de infección por *M. tuberculosis* en la comunidad. La infección primaria por *M. tuberculosis* causa enfermedad en el 5 -10% de los individuos, en los casos restantes, la respuesta inmune detiene el crecimiento de *M. tuberculosis*, sin embargo, el patógeno es completamente eliminado solo en el 10% de las personas infectadas, mientras que en los casos restantes, la respuesta inmune únicamente logra contener la infección, ya que algunos bacilos evaden la respuesta inmune celular del hospedero y permanecen en estado no replicante (latente). En este estado, denominado tuberculosis latente (TBL), el bacilo durmiente conserva su capacidad de replicación y causa enfermedad si ocurre alguna alteración en el sistema inmunológico (15). De aquellos individuos que presentan la infección latente solo del 5-10% desarrollarán la enfermedad durante el curso de sus vidas, sin embargo, el riesgo aumenta de 5-15% por año en presencia de inmunosupresión. El entendimiento de los mecanismos que conducen a la infección latente y a la enfermedad ha progresado notablemente durante los últimos años, sin embargo, aún no es posible del todo predecir de entre los sujetos infectados quiénes desarrollarán TB. Se conocen algunos factores de riesgo que predisponen a la enfermedad, como son: la infección por el Virus de la

Inmunodeficiencia Humana (VIH), la diabetes mellitus (DM), el uso prolongado de esteroides, el uso de inhibidores de factor de necrosis tumoral, el trasplante de órganos, entre otros. En todos estos pacientes es fundamental realizar el escrutinio de la TBL con el propósito de administrar el tratamiento (isoniacida por 6 a 9 meses) y disminuir el riesgo de enfermedad.

Las personas infectadas con *M. tuberculosis*, se pueden identificar mediante la TST seis a ocho semanas después de la exposición al bacilo de la tuberculosis. La TST es una intradermorreacción basada en la hipersensibilidad retardada en respuesta a una mezcla compleja de más de 200 antígenos de *M. tuberculosis* conocida como PPD. Esta prueba ha sido utilizada durante más de 100 años, y constituyó hasta hace un par de décadas, la única forma de diagnóstico de TBL. La induración mayor de 5 mm, (10 y 15 mm dependiendo de la prevalencia de enfermedad en la región) medida entre 48 a 72 horas después de la aplicación del PPD es considerada positiva. La TST no puede distinguir entre la infección por microorganismos del complejo *M. tuberculosis* (CMTB) y la sensibilización con otras micobacterias ambientales, dado que puede existir cierta reactividad por exposición a este tipo de micobacterias (16). Por otro lado, la vacunación con BCG puede causar falsos positivos pocos años después de su aplicación (0-5 años), sin embargo, este tipo de reactividad cruzada a los antígenos contenidos en el PPD, suele ocasionar reacciones de moderada intensidad (5-10 mm de induración) (17).

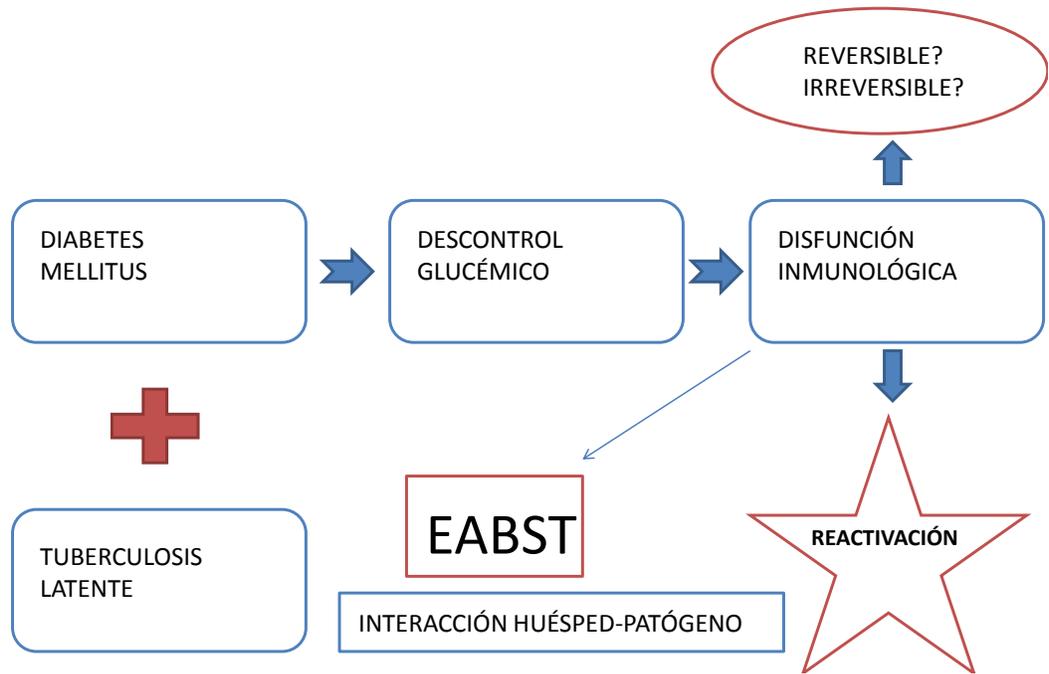
En la actualidad, se encuentran disponibles pruebas más sensibles y específicas (en comparación con la TST) para detectar TBL. Estas pruebas son denominadas ensayos de liberación de IFN- γ (IGRA), y permiten detectar la respuesta de las células T, ante la estimulación con los antígenos ESAT-6, CFP-10 entre otros, los cuales son específicos de *M. tuberculosis*. Estas pruebas son consideradas como positivas cuando se detecta secreción de Interferón- γ (IFN- γ) por las células T. Mediante técnica de ELISPOT el resultado en unidades formadoras de manchas (SFU *Spot Forming Units*) y se considera positivo cuando se detectan >8 SFU. Si se emplea la técnica de ELISA se pueden detectar directamente los niveles IFN- γ y el resultado se expresa en unidades internacionales por mililitro (positiva >35UI/mL). Se sabe bien que los antígenos utilizados en estas pruebas están codificados por genes ausentes en la cepa vacunal *M. bovis* BCG, y por lo tanto aumentan la especificidad en la población que ha sido vacunada. Sin embargo, estos genes se encuentran en condiciones nativas en la mayoría de las cepas silvestres de *M. bovis*, así como en algunas micobacterias ambientales (18, 19).

Si bien ambas pruebas (TST e IGRA) presentan variaciones respecto al estado de inmunosupresión del paciente. Se ha demostrado que la disregulación inmune en la diabetes no compromete la sensibilidad de los IGRA en pacientes con tuberculosis, por lo que puede ser una herramienta valiosa en esta población. El mecanismo por el cual los pacientes con diabetes mellitus son más susceptibles a la tuberculosis a pesar de su capacidad para secretar niveles elevados de interferón gama es intrigante y merece profundizar al respecto (IGRA y DM).

Tuberculosis y estatinas

La habilidad de *Mycobacterium tuberculosis* de mantener una infección crónica persistente está estrechamente ligado a su capacidad para utilizar el colesterol del huésped. Además los lípidos celulares encontrados en los macrófagos juegan un rol crucial en la reactivación de tuberculosis latente. Recientemente se publicó un estudio que demostró de forma experimental que las células mononucleares periféricas y los monocitos derivados de los macrófagos provenientes de pacientes con hipercolesterolemia familiar combinada, que recibieron tratamiento con estatinas presentaron resistencia aumentada a la infección por *M. tuberculosis*, comparado con las células provenientes de sujetos sanos, no usuarios de estatinas. Macrófagos murinos y humanos sujetos a tratamiento con estatina in vitro, presentaron una reducción significativa en el crecimiento de *M. tuberculosis*. En ratones tratados con estatina con tuberculosis experimental, mostraron protección frente a la misma infección. En conclusión, las estatinas incrementaron las funciones protectoras del huésped antagonizando la maduración del fagosoma y la autofagia, inducida por *Mycobacterium tuberculosis* (20).

MARCO CONCEPTUAL



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro medio la DM es el primer lugar como causa de muerte en México y se predice duplicará en un par de décadas. A su vez la asociación con TB presupone un incremento muy importante de los nuevos casos de esta última enfermedad. Las pruebas diagnósticas disponibles para TBL (IGRA/PPD) no predicen por si solas la progresión a tuberculosis activa, por lo que es necesario determinar mediante otras estrategias el riesgo de reactivación. Existe controversia acerca del papel único del descontrol glucémico como la causa de esta susceptibilidad incrementada.

4. JUSTIFICACIÓN

El efecto en la respuesta inmune contra tuberculosis en individuos con y sin descontrol glucémico, permitirá esclarecer el impacto del control glucémico estricto en esta población de pacientes y posteriormente diseñar estrategias para intensificar las medidas preventivas, diagnósticas y terapéuticas en esta población.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe diferencia en la actividad bactericida en sangre total contra *M. tuberculosis* de sujetos con diagnóstico de DM 2 y descontrol glucémico comparado con sujetos DM 2 y adecuado control glucémico y sujetos sanos?

Hipótesis

Existe una menor actividad bactericida en sangre total contra *M. tuberculosis* en sujetos con DM 2 e inadecuado control glucémico comparado con la actividad bactericida de sujetos con DM 2 y adecuado control glucémico y la actividad bactericida de sujetos sanos.

6. OBJETIVOS

Objetivo principal

Comparar la actividad bactericida en sangre total en sujetos que padecen DM 2 con adecuado control glucémico con la actividad bactericida en sangre total de individuos que padecen DM 2 con inadecuado control glucémico y con sujetos sanos.

Objetivos secundarios

Comparar la actividad bactericida en sangre total en sujetos que padecen DM 2 y PPD+ con adecuado control metabólico con individuos que padecen DM 2 y PPD+ con inadecuado control metabólico.

Comparar la actividad bactericida en sangre total en sujetos que padecen DM 2 e IGRA positivo con adecuado control metabólico con individuos que padecen DM 2 con inadecuado control metabólico e IGRA positivo.

Comparar la actividad bactericida en sangre total en sujetos que padecen DM 2 con inadecuado control metabólico con la de los mismos sujetos una vez alcanzado un adecuado control metabólico.

DEFINICIONES

TB LATENTE: Paciente asintomático con PPD+, esto es igual o mayor a 10 mm.

DM2 CONTROLADO: Paciente con diagnóstico y tratamiento de DM y con una determinación de HbA1c<7%

DM2 DESCONTROLADO: Pacientes con diagnóstico de DM y con una determinación de HbA1c>9%

SUJETO SANO: Paciente con nivel de glucosa en ayuno normal y sin antecedentes de DM en familiares de primer grado

7. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio:

Se realizará un estudio transversal comparativo prolectivo

2. Justificación del tamaño de muestra:

De acuerdo a los dispersión de los datos obtenidos de sujetos sanos PPD+ y de sujetos sanos PPD- de un estudio piloto en curso por este grupo de investigadores, se estimó un tamaño de muestra requerido para la comparación de 2 medias ($m_1 = 0.57$ $DS_1 = 0.15$ y $m_2 = 0.15$ $DS_2 = 0.11$) con un poder del 90% y un alfa de 0.05. Se requiere un mínimo de 15 individuos por grupo de estudio considerando una pérdida del 25%.

3. Lugar de estudio:

INCMNSZ, hospital de tercer nivel, México, DF.

4. Población de estudio:

Grupo de pacientes con DM2 que pertenezcan a la clínica de diabetes del INCMNSZ.

Individuos sanos candidatos a donadores renales del programa de trasplante del INCMNSZ.

5.- Periodo de estudio y seguimiento

:

El reclutamiento de los sujetos de estudio iniciará en abril de 2013 y concluirá en septiembre del 2014, se dará un seguimiento de 12 meses a los pacientes durante los cuales vigilara activamente la aparición de signos y síntomas de tuberculosis.

6.- Grupos a estudiar de esta población:

Grupo 1

Pacientes con DM 2 e inadecuado control glucémico ($HbA1c > 9\%$) y resultado de TST positiva

Grupo 2

Pacientes con DM 2 y adecuado control glucémico ($HbA1c < 7\%$) y resultado de TST positiva

Grupo 3

Pacientes con DM 2 e inadecuado control glucémico (HbA1c > 9%) y resultado de TST negativo

Grupo 4

Pacientes con DM 2 y descontrol glucémico (HbA1c < 7%) y resultado de TST negativo

Grupo 5

Individuos sanos y resultado de TST negativo

Grupo 6

Individuos sanos y resultado de TST positivo

Criterios de Inclusión:

Mayores de 18 años de edad

Que acepten participar en el nuevo estudio y firmen consentimiento informado

Que pertenezcan a la cohorte de la clínica de Diabetes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Criterios de exclusión:

Mayores de 65 años de edad

Antecedente de tuberculosis activa en cualquiera de sus formas diagnosticada por cultivo o manifestaciones clínicas.

Uso de medicamentos inmunosupresores.

Imposibilidad para obtener la muestra de sangre por venopunción.

Contacto reciente (menor de dos años) con personas que padezcan tuberculosis.

Radiografía de tórax con presencia de lesiones que sugieran Tb pulmonar activa.

Leucopenia o linfopenia documentada al momento de su inclusión

Evidencia de conversión a la prueba de tuberculina reciente

Pacientes en tratamiento para TBL con isoniacida

Ausencia de cicatriz de vacunación por BCG

Tabaquismo activo

Índice de masa corporal mayor de 30 y menor de 18

Consumo antibióticos con actividad sobre microorganismos del CMTB durante la semana previa a la toma de muestra (fluorquinolonas, claritromicina, amoxicilina-clavulanato, rifampicina, rifapentina, isoniacida, etambutol, pirazinamida, protionamida/etionamida, cicloserina, aminoglicosidos, PAS, linezolid, imipenem, meropenem)

Diagnóstico de insuficiencia renal crónica en cualquier estadio o bien la presencia de >300mg/ml de microalbuminuria de micción única

El grupo de sujetos sanos no debe tener historia familiar de diabetes mellitus en familiares de primer grado

Estrategia de cegamiento y sorteo

Se identificará a los individuos con un numero consecutivo por parte del investigador a cargo del reclutamiento y personal de laboratorio que realice las pruebas estará cegado al estado de TST, estado de IGRA y demás características del individuo de quien se procesa la muestra, el resultado del ensayo será relacionado con las características del individuo hasta que se hayan procesado la totalidad de las muestras.

METODOLOGÍA

Realizaremos un escrutinio en la cohorte de pacientes con diabetes mellitus del instituto y seleccionaremos aquellos que cumplan los criterios de inclusión.

- 1. APLICACIÓN DE CUESTIONARIO ESTANDARIZADO Y REALIZACIÓN DE HISTORIA CLÍNICA.** De forma inicial se aplicará un cuestionario estandarizado en donde se interrogarán síntomas relacionados a tuberculosis activa, además de factores de riesgo relacionados como tabaquismo prominente, consumo de leche no pasteurizada, COMBE, variables sociodemográficas como escolaridad y nivel socioeconómico. Posteriormente una historia clínica y exploración física completa para detectar signos y síntomas compatibles con tuberculosis activa. Se realizará una radiografía de tórax en posición posteroanterior que será interpretada por un radiólogo del instituto.
- 2. TOMA DE MUESTRA Y APLICACIÓN CON POSTERIOR LECTURA DEL PPD.** Se tomará una muestra de sangre venosa para la realización de biometría hemática, IGRA y el ensayo de actividad bactericida en sangre total. Para lo cual requeriremos la cantidad aproximada de 20 ml. En aquellos pacientes en los que no tengan documentada la prueba de tuberculina, la realizaremos posterior a la toma de sangre venosa para evitar interferencia con el ensayo de actividad bactericida. La realización de la prueba de tuberculina se realizará por medio de la administración intradérmica de 5 UT de PPD en 0.1 ml de solución con una jeringa de insulina en la región supina del antebrazo. La reacción en la piel se leerá en 48-72 hrs. Una prueba positiva se define por el diámetro de induración, no eritema, en respuesta a 5 unidades de tuberculina. El diámetro debe ser leído con un vernier iniciando en el primer sitio de elevación cutánea. Un corte de 10 mm se considerará como prueba positiva. Todos los pacientes con diagnóstico de tuberculosis latente recibirán al seguimiento y tratamiento apropiados en base a las recomendaciones actuales.
IGRA (GOLDEN DESCRIBIR EL PROTOCOLO) Y DESCRIBIR CÓMO SE REALIZÓ
- 3. ENSAYO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA EN SANGRE TOTAL.** Una vez realizado el cuestionario, la historia clínica y exploración física completa y la toma de muestras. Procederemos a la clasificación de los pacientes en base a los grupos de estudio y a la realización de las actividades bactericidas en sangre total.

4. **ANÁLISIS DE LOS DATOS Y SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS LATENTE.** Finalmente analizaremos los resultados. En todos los pacientes diagnosticados con tuberculosis latentes recibirán un seguimiento estrecho para la detección oportuna de cualquier signo o síntoma sospechoso de tuberculosis activa. El seguimiento estrecho será a través de citas programadas 2 veces por mes el primer mes y posteriormente de forma mensual hasta la conclusión del estudio. En caso de presentar síntomas/signos compatibles con tuberculosis en tiempo fuera de sus citas programadas, se revisará vía servicio de urgencias las 24 hrs todos los días de la semana.

Determinación de actividad bactericida en sangre total utilizando la plataforma BACTEC 960/MGIT

Se determinará la actividad bactericida en sangre total de acuerdo a la metodología proporcionada por el Dr. Robert Wallis empleada en los estudios recientes en estudios de fármacos y comparación de inmunidad a diferentes cepas.

1.- Cultivo y conservación del stock.

De una cepa de *M. tuberculosis* H37Rv de referencia de 3 semanas de crecimiento en medio de cultivo sólido (Lowestein Jensen), se realizará una suspensión la cual se ajustará a 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml) mediante un nefelómetro y posteriormente se realizará una dilución 1:200. Posteriormente se agregaran 400µL de la dilución a 6 tubos MGIT suplementados con OADC y se incubarán en el aparato BACTEC 940, hasta su positividad, posteriormente el contenido de los tubos será mezclado y homogeneizado mediante agitación en vortex y se colocarán diferentes volúmenes en tubos de crio preservación y serán congelados a -70 C. Lo anterior asegura que la cepa se encuentre en la misma fase de crecimiento al ser utilizada en los experimentos.

2.- Titulación del stock

Se descongelará una alícuota de 1200 µL de la cepa y se inocularán 2 tubos MGIT con cada una de las siguientes diluciones 500, 50, 5, 0.5, 0.05 y 0.005, se registrará el tiempo de positividad en días y horas registrado por el BACTEC 950 y se alimentaran los datos en el software diseñado para este propósito (RS Wallis) en donde mediante una regresión exponencial se determinará una curva predicho y determinara el volumen requerido de stock para un crecimiento en BACTEC 960 de 7 días.

$$y=y_0+ae^{-bx}$$

y=TTP en días

x= log volumen inoculo en μ L

3.- Cultivo en sangre.

Se tomará el inoculo calculado para un crecimiento en 7 días y se agregara a un tubo Eppendorff de 2 ml por duplicado para cada tiempo de lectura (0, 24, 48, 72 y 96 hrs) para cada individuo. Se centrifugará a 10,000 rev/min por 10 min, se retirará el sobrenadante, posteriormente el pellet se re suspenderá en 300 μ L medio de cultivo RPMI mediante agitación en vortex. Se agregará 300 μ L de sangre completa heparinizada en cada tubo y se incubarán a 37 C en agitación suave hasta su tiempo de cosecha.

4.- Cosecha de micobacterias del cultivo en sangre.

En cada tiempo de lectura, se tomaran ambos tubos, se centrifugaran a 10,000 rev/min por 5 min, se retirará el sobrenadante y se colocará en tubos Eppendorff de 1.5 ml para su congelación a -70C y determinación de citocinas. Posteriormente se agregará 1 ml de agua estéril a los tubos y se dejaran reposar a temperatura ambiente durante 10 min para realizar la lisis osmótica de los componente celulares, posteriormente se centrifugaran nuevamente a 10,000 rev/min x 10 min, se retirara el sobrenadante y el pellet se resuspenderá en 500 μ L de medio de cultivo Middlebrook 7H9 y se agregarán a tubos MGIT los cuales se incubarán en el aparato BACTEC 940 y se registrará el tiempo de positividad en horas y días para ser analizado en el software. Para cada experimento se sembrará el volumen de la cepa especificada para el crecimiento en 7 en tubos MGIT sin sangre y por duplicado para asegurar la viabilidad de la cepa.

Detección de citocinas.

De los sobrenadantes de determinarán las concentraciones de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 por técnica de ELISA utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas (Becton-Dickinson® Oxford UK) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Se generarán curvas estándar utilizando citocinas de referencia. Los resultados serán expresados como la media de dos lecturas para cada muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

VARIABLES A MEDIR

El resultado obtenido del software deriva de la relación inversa proporcional que existe entre TDP (tiempo de positividad del MGIT) y el log del inóculo (volumen). La $\Delta \log$ UFC (cambio en la viabilidad durante el cultivo en sangre) se puede calcular como el $\log(\text{final}) - \log(\text{inicial})$, donde inicial y final son los volúmenes del stock de cultivo que corresponden a los valores de TDP del inóculo inicial y de la lectura obtenida en el cultivo de sangre completo.

Se llevará a cabo un análisis descriptivo de los datos utilizando medidas de tendencia central y de dispersión (media \pm desviación estándar; mediana) para las variables continuas donde evaluará inicialmente la normalidad de la distribución utilizando los indicadores de sesgo y curtosis. En el caso de las variables cualitativas, se utilizarán frecuencias absolutas y relativas (porcentajes).

Se determinará la media y desviación estándar de la $\Delta \log$ UFC de cada grupo de individuos y se realizará la prueba *t*-student para determinar la significancia estadística para la comparación entre 2 grupos, para la comparación entre más de 2 grupos se determinará mediante ANOVA con ajuste de Bonferroni.

Para la comparación entre la $\Delta \log$ UFC durante el control glucémico inadecuado y la $\Delta \log$ UFC al obtener un control glucémico adecuado (antes y después), se realizará una *t*-pareada o rangos señalados de Wilcoxon según corresponda.

Se considerarán estadísticamente significativas a las variables que presenten un valor de $p < 0.05$

8. RESULTADOS

Hasta marzo del 2014 se lograron incluir 21 sujetos con DM 2. Trece pacientes con una hemoglobina glucosilada HbA1c <7%, ocho pacientes con una hemoglobina glucosilada HbA1c>9% y nueve sujetos sanos. Trece sujetos con DM 2 informaron el consumo de estatinas por más de seis meses.

La mediana del log/UFC en los sujetos DM 2 fue de 0.9382 (IIC 0.573-1.490) Y DE 1.260 (IIC 0.911-1.507) en los no DM 2 $p=0.341$.

La mediana del log/UFC de los sujetos DM 2 HbA1c <7% fue de 0.926 (IIC 0.539-1.354) Y de 1.170 (IIC 0.555-1.512) en los sujetos con DM 2 HbA1c >9%; $p=0.526$.

La mediana del log/UFC en los sujetos con estatinas fue de 0.900 (IIC 0.440-1.312) y de 1.411 (IIC 0.785-1.753) en los sujetos sin estatinas $p=0.05$.

DM sin Estatina vs No DM

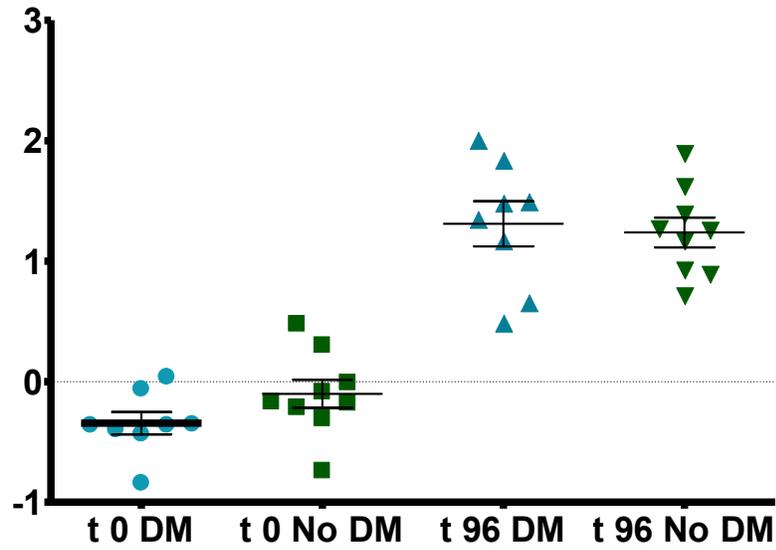


Gráfico 1. Se muestra $\Delta \log \text{UFC}$ en pacientes diabéticos y no diabéticos a las 0 horas y a las 96 horas.

DM con Estatina vs No DM

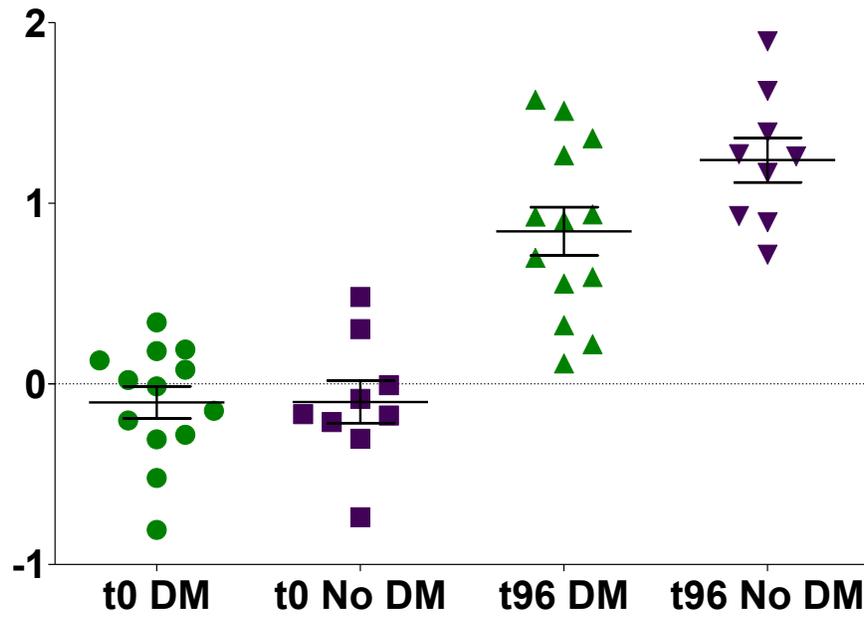


Gráfico 1. Se muestra $\Delta \log \text{UFC}$ en pacientes diabéticos y no diabéticos a las 0 horas y a las 96 horas.

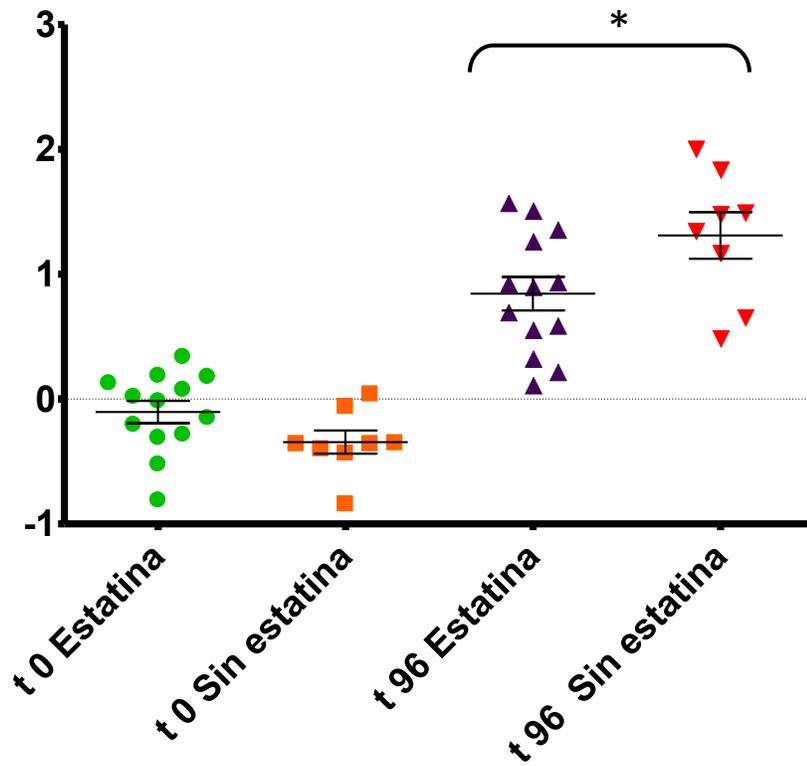


Gráfico 2. Se muestra $\Delta \log \text{UFC}$ en pacientes Diabéticos que consumen estatinas y no diabéticos a las 0 horas y a las 96 horas.

*P=0.04

DM <7% HbA1c vs DM >9% HbA1c

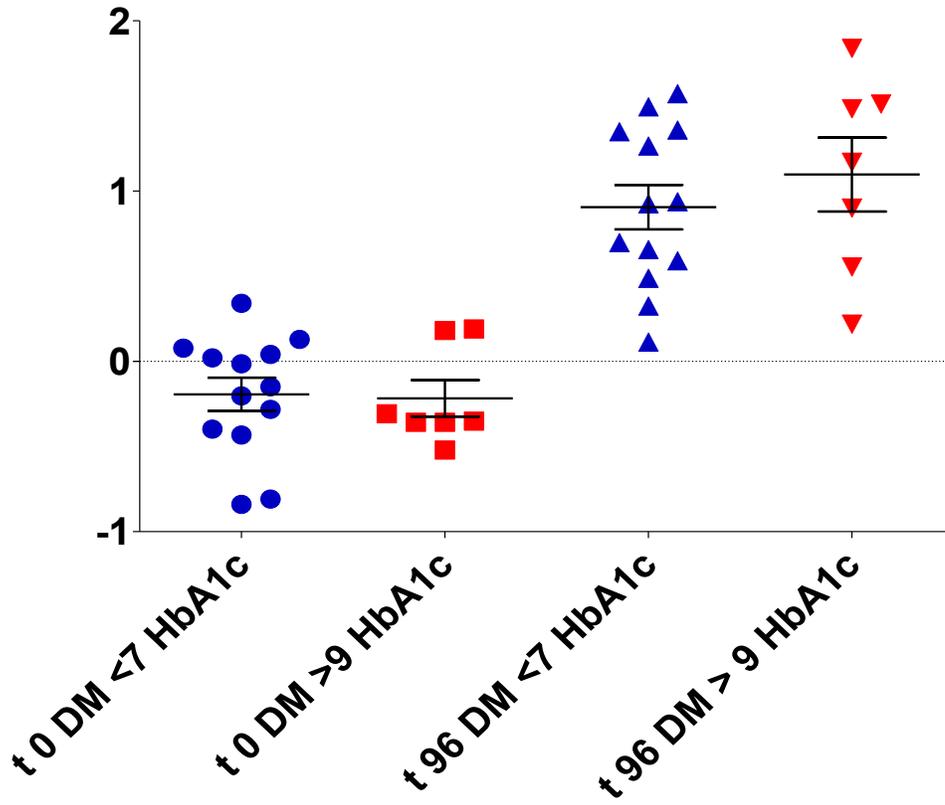


Gráfico 3. Se muestra $\Delta \log \text{UFC}$ en pacientes diabéticos con HbA1c < 7% y HbA1c > 9% y no diabéticos a las 0 horas y las 96 horas.

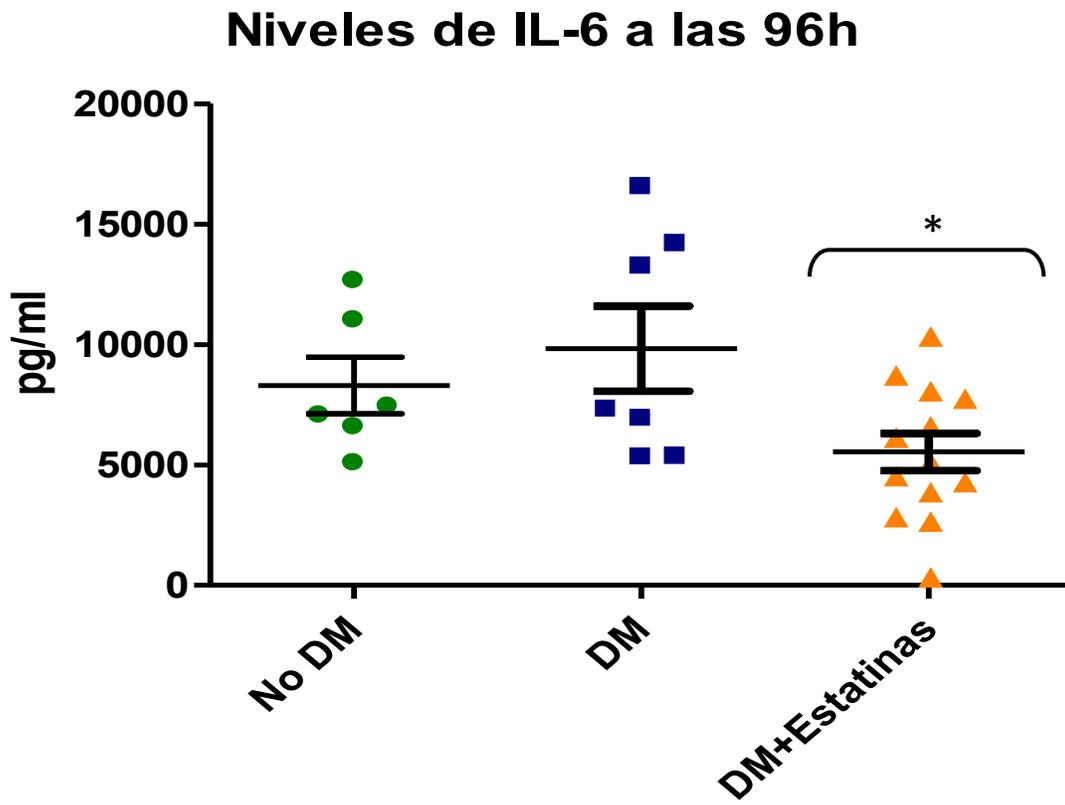


Gráfico 4. Se muestran los niveles de IL-6 medidos en pg/ml en pacientes diabéticos que consumen o no estatinas en el sobrenadante del co-cultivo con la micobacteria a las 96h.

*P=0.03

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Estos resultados en conjunto sugieren que un control glucémico estricto además del uso adyuvante de estatinas como parte del tratamiento para el control metabólico en general puede contribuir a la contención de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

Los niveles bajos de IL-6 observados en los pacientes que consumen estatinas (pacientes con mayor actividad bactericida), concuerdan con estudios previos que establecen que la secreción de IL-6 por macrófagos infectados es un mecanismo mediante el cual la micobacteria inhibe la respuesta interferón-dependiente por parte de los macrófagos no infectados.

Estos resultados preliminares permiten tener una adecuada estructura para el seguimiento prospectivo de los pacientes diabéticos. Una vez completado el tamaño de muestra tendremos las conclusiones definitivas. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento, surgen nuevas hipótesis, que requieren un diseño de estudio específico para su adecuada comprobación.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Global tuberculosis control: key findings from the December 2009 WHO report. *Wkly Epidemiol Rec*;85:69-80.
2. Christie Y, Jeon, Megan B, Murray. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. *PLoS Medicine*. July 2008. Vol 5. Issue 7. E152.
3. The risk of tuberculosis disease among persons with DM: A prospective cohort study. *CID*. 2012
4. Dobler C, Flack J, Barrington G. Risk of tuberculosis among people with diabetes mellitus: an Australian nationwide cohort study. *BMJ* 2012;2:e000666.
5. Leegard A, Riis A, Kornum JB, Prael JB. Diabetes, glycemic control, and risk of Tuberculosis. A population-based case-control study. *Diabetes Care* 34:2530-2535, 2011.
6. Stevenson CR, Forouhi NG, Roglic G, Williams BG, Lauer JA, et al. (2007) DM and tuberculosis: the impact of the DM epidemic on tuberculosis incidence. *BMC Public Health* 7: 234.
7. Diabetes, Glycemic control, and Risk of Tuberculosis. *Diabetes Care*, Vol 34, December 2011.
8. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*;2011:814943.
9. Qu HQ, Rentfro AR, Lu Y, Nair S, Hanis CL et al. Host susceptibility to tuberculosis: insights from a longitudinal study of gene expression in diabetes. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012 March; 16(3): 370-372.
10. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2002;347:1860-6.
11. Martens GW, Arikian MC, Lee J, Ren F, Greiner D, et al. (2007) Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 518-524.
12. Yamashiro S, Kwakawi K, Uezu K, Kinjo T, Miyagi K, et al. (2005) Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 139: 57-64.
13. Delamaire M., Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allanic H, et al. (1997) Impaired Leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 14: 29-34.
14. Corona ME, Curz LP, García L, Rerreyra L, Delgado G et al. Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax* 2013;68:214-220.
15. Miranda C, Tomford JW, Gordon SM. Interferon-gamma-release assays: Better than tuberculin skin testing? *Cleve Clin J Med*;77:606-11.
16. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*;2011:814943.
17. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4:761-76.

18. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008;149:177-84.
19. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59:1-25.
20. Parihar SP, et al. Statin Therapy Reduces the *Mycobacterium tuberculosis* Burden in Human Macrophages and in Mice by Enhancing Autophagy and Phagosome Maturation. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;209:754-63 2010;10(9):597-602.