



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
SOLUBLES PARA EVALUAR LA EFICACIA AL
TRATAMIENTO EN PACIENTES CON
TUBERCULOSIS PULMONAR MULTI-FÁRMACO
RESISTENTE (TB-MFR)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSCAR VELAZQUEZ BAZALDUA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
SEPTIEMBRE 2015**

Ciudad Univesitaria, D. F.



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.

DEDICATORIA

A:

Dios, por darme esta nueva oportunidad de desarrollarme espiritualmente y por estar conmigo en todo momento, en especial en los momentos espinosos, por fortalecer mi interior, iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellos que han sido mi soporte y compañía.

El, por su luz, su sabiduría, su humildad, su amor y sus enseñanzas dejando su huella imborrable en mí, por entrar en mi vida y transformar mi pensamiento inclinándome hacia lo mejor haciendo de mí una persona especial. A ti que en oro transformas la vida.

Su ejército, por contribuir en mi desarrollo y su protección.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mis padres, por todo su cariño, su amor, su apoyo incondicional y por creer en mí.

Mi tío Leo por todos sus consejos de luz y sabiduría, por enseñarme a alcanzar mis metas y siempre estar a mi lado.

Mi tía Toña por su cariño que siempre me impulsa, por compartir sus experiencias y siempre estar conmigo.

Ian y Cris, por compartirme de su paz, ternura, amor y por su infinidad de sonrisas.

Lesli por todo su cariño, amor, sabiduría, consejos, conocimientos, apoyo y por su limpieza y pureza interior.

Todos mis amigos que siempre han estado a mi lado y me han apoyado.

Todos aquellos que contribuyeron de forma directa o indirecta para la elaboración de esta investigación.

Las profesoras del INER (Dra. Martha, Dra. Tere, Dra. Silvia y a la Dra. Esmeralda) quienes compartieron sus conocimientos y experiencias.

Y en especial a la Dra. Yolanda, por todo su tiempo y dedicación para hacer posible esta Tesis.

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| Abreviaturas..... | 1 |
| Resumen | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Epidemiología de la tuberculosis..... | 3 |
| Cuadro Clínico..... | 4 |
| Diagnóstico..... | 4 |
| Tratamiento..... | 7 |
| Tuberculosis Multi-Fármaco Resistente (TB-MFR)..... | 8 |
| Resistencia a fármacos..... | 8 |
| Epidemiología de TB-MFR..... | 9 |
| Diagnóstico de TB-MFR..... | 10 |
| Tratamiento de TB-MFR..... | 11 |
| Respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i> | 13 |
| Células mediadoras de la respuesta inmune..... | 14 |
| Linfocitos T CD4 ⁺ | 14 |
| Linfocitos T CD8 ⁺ | 15 |
| Reconocimiento de antígenos micobacterianos en el contexto CD1..... | 15 |
| Células Polimorfonucleares (PMNs)..... | 15 |
| Citocinas mediadoras de la respuesta inmune en TB..... | 16 |
| Interferón Gamma (IFN- γ)..... | 16 |
| Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)..... | 17 |
| Interleucina 12 (IL-12)..... | 18 |
| Interleucina 1 β (IL-1 β)..... | 18 |
| Receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra)..... | 19 |
| Interleucina 2 (IL-2)..... | 19 |
| Interleucina 6 (IL-6)..... | 19 |
| Interleucina 8 (IL-8)..... | 20 |
| Interleucina 9 (IL-9)..... | 20 |
| Interleucina 10 (IL-10)..... | 20 |
| Interleucina 17 (IL-17)..... | 21 |

| | |
|---|----|
| Interleucina 7 (IL-7) e Interleucina 15 (IL-15)..... | 21 |
| Citocinas producidas en respuesta Th2: Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5) e Interleucina 13 (IL-13) | 22 |
| Eotaxina..... | 22 |
| Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico (FGF-Basic)..... | 23 |
| Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF). | 23 |
| Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF)..... | 23 |
| Proteína 10 Inducible por IFN- γ (IP-10). | 24 |
| Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1 (MCP-1)..... | 24 |
| Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 α (MIP-1 α) y 1 β (MIP-1 β)..... | 24 |
| Proteína reguladora en la activación, expresada y secretada por células T (CCL5 / RANTES). | 25 |
| Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas $\beta\beta$ (PDGF- $\beta\beta$),..... | 25 |
| Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)..... | 25 |
| Biomarcadores en Tuberculosis. | 25 |
| Justificación | 28 |
| Hipótesis | 29 |
| Objetivo general | 29 |
| Objetivos particulares | 29 |
| Métodos | 30 |
| Grupo de estudio..... | 30 |
| Muestras biológicas. | 31 |
| Separación de suero..... | 31 |
| Ensayo multiplex con Bio-Plex..... | 31 |
| Adquisición de datos. | 33 |
| Análisis de datos..... | 33 |
| Resultados | 34 |
| Características clínicas y demográficas de los pacientes con TB-MFR..... | 34 |
| Biomoléculas de respuesta temprana al tratamiento en pacientes con TB-MFR | 36 |
| Biomoléculas de respuesta tardía al tratamiento en pacientes con TB-MFR..... | 41 |
| Biomoléculas de eficacia al tratamiento en pacientes con TB-MFR..... | 51 |

| | |
|-------------------------------|----|
| Discusión | 54 |
| Limitaciones del estudio..... | 57 |
| Conclusión | 57 |
| Bibliografía..... | 58 |

Abreviaturas.

| | |
|--------------------------------|---|
| BAAR | Bacilos ácido-alcohol resistentes. |
| BCG | Bacillus de Calmette-Guerin. |
| CFP10 | Proteína de Filtrado de Cultivo de 10 kDa. |
| DM2 | Diabetes Mellitus tipo 2. |
| ESAT-6 | Objetivo Antigénico de Secreción Temprana de 6 kDa. |
| VEGF | Factor de Crecimiento Endotelial Vascular. |
| FGF | Factor de Crecimiento de Fibroblastos. |
| G-CSF | Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos. |
| GM-CSF | Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos. |
| IL | Interleucina. |
| IFN-γ | Interferón Gamma. |
| IP-10 | Proteína 10 Inducible por IFN- γ . |
| <i>M. tuberculosis</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . |
| MCP | Proteína Quimioatrayente de Monocitos. |
| MHC | Complejo Principal de Histocompatibilidad |
| MIP | Proteína Inflamatoria de Macrófagos. |
| OMS | Organización Mundial de la Salud. |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa. |
| PDGF | Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas. |
| PPD | Derivado proteico purificado. |
| PFS | Pruebas de fármaco-sensibilidad. |
| RANTES/CCL5 | Proteína reguladora en la activación, expresada y secretada por células T |
| TB | Tuberculosis. |
| TB-MFR | Tuberculosis Multi-Fármaco Resistente. |
| TNF-α | Factor de Necrosis Tumoral- Alfa |
| TST | Prueba de tuberculina. |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana. |

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa de difícil control debido a la aparición de cepas resistentes a fármacos, principalmente a isoniazida y rifampicina. El tratamiento de la TB es prolongado y el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* es el método de diagnóstico. Sin embargo, este método no es útil para el seguimiento del tratamiento, por tal motivo se requiere desarrollar nuevos métodos, que incluyan el estudio de biomarcadores que indiquen de algún modo la efectividad del tratamiento, estos biomarcadores tienen como base el hecho de que las células del sistema inmune responden hacia antígenos de *M. tuberculosis* con la producción de moléculas solubles a nivel local y sistémico, y que la variación de la respuesta se debe a diferencias en las concentraciones de las moléculas solubles durante las etapas de la enfermedad. En esta tesis se cuantificó a la IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxina, FGF-Básico, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , PDGF- $\beta\beta$, MIP-1 β , RANTES, TNF- α y VEGF en suero de pacientes con TB-MFR para la identificación de biomarcadores. La cuantificación se llevó a cabo durante el tratamiento con un ensayo multiplex con la plataforma de Bio-Plex en 12 pacientes reclutados durante el periodo de 2010 -2014. Debido a que no hay datos previos de las concentraciones de éstas moléculas en el suero de pacientes con TB-MFR, primero se comparó la concentración de las 27 moléculas antes de la terapia con respecto a los tiempos de seguimiento y término de tratamiento para conocer su comportamiento. Se observó que a los 3 meses disminuyen las moléculas pro-inflamatorias como IL-8, IL-6 e IFN- γ , a los 6-7 meses disminuyen las moléculas anti-inflamatorias como IL-1ra, IL-4, IL-10 e IL-13, a tiempos tardíos disminuyen las moléculas pro-inflamatorias como IL-8, IL-6, IL-12 e IFN- γ y factores de crecimiento como G-CSF, FGF-Básico y VEGF(11-12 meses) y al final de tratamiento hay una disminución general de todos los grupos de moléculas analizadas. Para la identificación biomarcadores de eficacia al tratamiento, se realizaron comparaciones múltiples de las 27 moléculas en todos los tiempos respecto al valor inicial antes de la terapia y se concluye que una disminución con respecto a los valores iniciales, de IP-10, IL-8, IFN- γ , IL-4, IL-9 y G-CSF, y un incremento de eotaxina se asociaría con una terapia exitosa mientras un comportamiento diferente de estas moléculas indicaría una falla al tratamiento.

Introducción.

Epidemiología de la tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que afecta a millones de personas en todo el mundo anualmente. Se ubica como la segunda causa de muerte provocada por un agente infeccioso, solo superada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara que sigue siendo un problema de salud global. Las últimas estimaciones a nivel mundial (2012) calculan una incidencia de 8,6 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1,3 millones de muertes por TB.(1)

Según la OMS en el año 2013, en México se detectaron 19,703 nuevos casos de tuberculosis (de los cuales 16,080 fueron TB-pulmonar) y 1,005 recaídas, notificándose un total de 20,708 casos, con una incidencia estimada de 21 (18-23) por 100 mil habitantes.(2)

La ruta por la cual se transmite la infección es por vía aérea, mediante la inhalación de pequeñas gotas de flugge de 1-5 micras de diámetro que son producidas por pacientes con TB pulmonar infectados con *M. tuberculosis* en actividades cotidianas como el habla, la risa y principalmente al toser.(3) Se considera que un enfermo con TB pulmonar que no recibe tratamiento puede infectar de 10 a 15 personas en un año y del 5% al 10% de los infectados pueden desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida.(4)

Sin embargo, no todas las personas que se infectan desarrollan la enfermedad, el mayor riesgo de la aparición clínica de la enfermedad es de los 6-12 meses posteriores a la infección, y depende de diversos factores como las condiciones higiénicas, ambientales, socioculturales, edad y la recurrencia al contacto de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), y por enfermedades que causan deficiencia en el sistema inmune como la diabetes mellitus y el VIH-SIDA.(4,5)

Etiología.

El principal agente etiológico de la TB es *Mycobacterium tuberculosis*, éste es un bacilo ácido-alcohol-resistente con un tamaño aproximado de 0.2 a 0.6 x 1 a 10 µm, es aerobio no esporulado e inmóvil.(6,7) Posee una pared celular con un alto contenido en lípidos (50-60%) que le confiere un carácter hidrofóbico y una efectiva barrera frente a muchos agentes desinfectantes como el cloruro o bromuro de cetilpiridinio y el trifosfato de sodio.(8,9) Es un microorganismo resistente al frío, a la congelación y a la desecación y sensible al calor, a la luz solar y a la luz ultravioleta. Su crecimiento depende de las condiciones locales donde se desarrolla, como: la presencia de oxígeno y el pH del medio, lo que puede ocasionar un estado de latencia que va desde algunos días a varios años, su división es lenta ya que es cada 16 a 20 horas. *M. tuberculosis* puede afectar cualquier órgano o tejido, aunque la localización más frecuente es la pulmonar que es la vía de entrada del bacilo. El reservorio natural es el humano.(3,4)

Cuadro Clínico.

Cuando la persona desarrolla TB activa el cuadro clínico es de comienzo engañoso y naturaleza crónica. Los síntomas generales son tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, agotamiento, dolor torácico, que pueden ser leves por varios meses, lo que provoca que las personas tarden en buscar atención médica y transmitan la bacteria a otras personas. La tos es por mucho el síntoma más frecuente; al inicio puede ser seca y a medida que avanza la enfermedad se transforma en productiva, con expectoración mucosa, mucopurulenta o hemoptoica (con sangre) y con presencia de bacilos, el individuo también presenta lesiones pulmonares que van desde granulomas hasta la formación de cavitaciones.(10,11)

Diagnóstico.

En el diagnóstico de la TB la radiología de tórax es un estudio tradicionalmente utilizado pero poco específico, debido a que las imágenes obtenidas pueden corresponder a otro agente causal o a otra patología como a una neumonía bacteriana causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Histoplasma capsulatum* o *Staphylococcus aureus*. Las

imágenes radiológicas pueden sugerir el diagnóstico de la TB pero no establecerlo por sí mismas, sin embargo pueden ser útiles para conocer la localización y extensión de las lesiones. El cuadro clínico y los hallazgos radiológicos pueden hacer sospechar el diagnóstico e iniciar con los procedimientos para la obtención de muestras adecuadas para el diagnóstico bacteriológico.(12)

Una de las pruebas de diagnóstico más antiguas aún utilizada en el mundo es la prueba de la tuberculina (TST, por sus siglas en inglés Tuberculin Skin Test). Esta prueba pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad del organismo del hospedero en respuesta a un derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*, que se obtiene del medio de cultivo sintético de *M. tuberculosis* destruido por el calor y eliminado por filtración.(13) La vacunación previa con BCG (Bacillus de Calmette-Guerin) o el contacto previo con micobacterias ambientales puede positivizar la TST. Una TST positiva no necesariamente es sinónimo de TB activa, solo puede indicar contacto previo con micobacterias. Una limitación importante de la TST es la falta de especificidad debido a la reacción cruzada con antígenos presentes en otras especies de micobacterias, incluyendo el Bacillus Calmette-Guerin, una cepa atenuada de *M. bovis*.(12,14)

A nivel del laboratorio el diagnóstico microbiológico de la TB se basa en la identificación del agente causal, que se establece en tres etapas: 1) presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes mediante tinciones específicas, 2) el aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo puro y posterior identificación de especie y 3) estudio de sensibilidad a fármacos antituberculosos.(12)

El diagnóstico microbiológico de la TB pulmonar se basa en la baciloscopía de distintas muestras biológicas, generalmente del esputo porque es la muestra más fácil y accesible de obtener. En la baciloscopía de esputo se identifican a los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) teñidos por la técnica de Ziehl-Nielsen. La identificación de BAAR en el examen microscópico solo indica sospecha de tuberculosis, debido a que la ácido-alcohol resistencia no es exclusiva de *M. tuberculosis*. A pesar de que la baciloscopía es una prueba sencilla, rápida y de bajo costo muestra inconvenientes pues se requieren de 5,000 a 10,000

bacilos por ml de muestra para que sea positiva y es un procedimiento con alta especificidad pero baja sensibilidad.(12,15)

La baciloscopía se cuantifica en 1 a 3 cruces (+ a +++) luego de analizar la lectura de por lo menos 100 campos microscópicos: +++: más de 10 BAAR x campo, ++: 1-10 BAAR x campo y +: 1-10 BAAR x 10 campos.(11)

El cultivo, al identificar con certeza a *M. tuberculosis* y poder evidenciar un mínimo de 10 a 100 BAAR presentes en una muestra, si es realizado en forma adecuada, es considerado el estándar de oro para el diagnóstico de la TB. Además, el cultivo detecta únicamente bacilos vivos. (8,16)

Existen dos tipos de medio de cultivo, sólidos y líquidos. En los sólidos el desarrollo es más lento pero puede visualizarse la morfología de las colonias. Se considera positivo un cultivo con más de 10 colonias aunque los de menor número deben considerarse en el contexto clínico. Los medios líquidos permiten un desarrollo más rápido de las micobacterias, pero no se aprecia la morfología de las colonias.(11)

Sin embargo, el cultivo tiene sus desventajas pues además de que *M. tuberculosis* es de lento crecimiento, necesita medios más sofisticados que la baciloscopía y es más costoso. El medio de cultivo sólido más usado es el Lowenstein-Jensen porque los nutrientes de este medio basal, más los aportados por el agregado de la mezcla de huevo, constituyen un rico soporte para el crecimiento de una gran variedad de micobacterias, el verde de malaquita inhibe gran parte de la flora acompañante. Con el agregado de glicerina se estimula el crecimiento de *M. tuberculosis* y tarda de 3 a 6 semanas en detectar crecimiento bacteriano. Existen otros medios más rápidos, de 1 a 3 semanas como el radiométrico BACTEC, pero por su elevado costo en equipo, reactivos y mantenimiento, están fuera de uso, o el método BACTEC MGIT 900, que utiliza medio líquido y un revelado de desarrollo bacteriano por fluorescencia permitiendo en 10-13 días obtener resultados positivos. Los negativos se observan hasta 42 días.(5,17)

Tratamiento.

La TB es una enfermedad que se puede curar y tratar siempre y cuando se sigan los procedimientos terapéuticos estandarizados por organismos internacionales como es la OMS.(17)

El tratamiento contra la TB se basa en el programa de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) recomendado por la OMS, consiste en que los pacientes deben de recibir los medicamentos antituberculosos en cualquier sitio (Centro de Salud, hospital, área de trabajo e incluso en casa) bajo la observación de un médico o persona especializada que asegure su ingesta.(17)

El tratamiento se basa en un esquema terapéutico (tabla 1) que requiere un mínimo de 6 meses, dividido en dos fases: 1) Fase intensiva o esterilizante (2 meses) y 2) Fase de consolidación (4 meses). El esquema terapéutico esta constituido de medicamentos de primera línea que son los más potentes y de menor toxicidad. Los fármacos de primera línea son isoniazida, rifampicina, pirazinamida y estreptomycinina siendo drogas con actividad bactericida (capacidad para matar grandes cantidades de bacilos que se encuentran con alta actividad metabólica), de diferente intensidad. También se usa el etambutol el cual es bacteriostático (capacidad para impedir la reproducción bacteriana).(11,18)

Tabla 1. Dosis recomendada de medicamentos antituberculosos de primera línea para adultos

| Medicamento. | Dosis recomendada | | | |
|------------------|---|----------------|---|----------------|
| | Diaria | | 3 veces por semana | |
| | Dosis y rango (mg/kg de peso corporal) | Máximo (mg) | Dosis y rango (mg/kg de peso corporal) | Máximo (mg) |
| Isoniazida | 5 (4-6) | 300 | 10 (8-12) | 900 |
| Rifampicina | 10 (8-12) | 600 | 10 (8-12) | 600 |
| Pirazinamida | 25 (20-30) | - | 35 (30-40) | - |
| Etambutol | 15 (15-20) | - | 30 (25-35) | - |
| Estreptomycinina | 15 (12-18) | | 15 (12-18) | 1000 |

. * Tomada de Treatment of tuberculosis guidelines.(19)

Tuberculosis Multi-Fármaco Resistente (TB-MFR).

La TB-MFR es un tipo de tuberculosis en la cual el bacilo (*M. tuberculosis*) no responde al tratamiento con los antibióticos isoniazida y rifampicina, los dos medicamentos anti-tuberculosos más potentes de primera línea.(10)

Resistencia a fármacos.

Se han encontrado cepas de *M. tuberculosis* resistentes a un medicamento anti-TB de primera línea en todos los países estudiados por la OMS.(10) La resistencia primaria a fármacos anti-tuberculosos es producida por mutaciones espontaneas en el interior del genoma de *M. tuberculosis*, independientemente de la exposición a la terapia y las mutaciones suelen codificar resistencia a un solo fármaco porque los sitios de resistencia para fármacos individuales no están entrelazados por lo que la probabilidad de que se presenten espontáneamente cepas mutantes con resistencia a más de un fármaco es baja. Por tal motivo, los bacilos resistentes a un fármaco pueden ser eliminados utilizando dos o más medicamentos, pues es posible que al menos sea susceptible a uno de ellos. La frecuencia de aparición de cepas mutantes resistentes, durante el proceso replicativo de *M. tuberculosis*, varía dependiendo del fármaco, para isoniazida, estreptomicina Pirazinamida y etambutol es de 1×10^{-6} y para rifampicina de 1×10^{-8} .(20,21)

Existe otra forma de resistencia conocida como secundaria o adquirida, en donde se seleccionan cepas resistente que se desarrolla en pacientes que han recibido quimioterapia antituberculosa inadecuada o de mala calidad, intolerancia a los fármacos o incumplimiento del tratamiento.(20)

En algunos casos más severos la resistencia a fármaco puede desarrollar TB extensivamente resistente (XFR), en la que se seleccionan cepas resistentes al menos a isoniazida y rifampicina, resistentes a fluoroquinolonas y resistentes al menos a un farmaco de segunda línea inyectable (capreomicina, amikacina o kanamicina).(3)

Epidemiología de TB-MFR.

A nivel mundial en el 2012 se estimaron 450,000 (intervalo: 300,000-600,000) nuevos casos de TB-MFR. Se calcula que el 3.6 % (2.1 a 5.1%) de nuevos casos y el 20.2% (13.3-27.2%) de casos previamente tratados son TB-MFR. Los países europeos y especialmente Asia central tienen los niveles más altos de casos de TB-MFR (casos nuevos y previamente tratados) (Figura 1 y 2).(1)

En gran parte del continente americano los niveles de resistencia a medicamentos de casos nuevos es bajo (<3%) (Figura 1).(1) Hablando específicamente de México, en el 2013, se estimaron 390 (340-450) nuevos casos de TB-MFR y 99 (78-120) casos previamente tratados.(2)

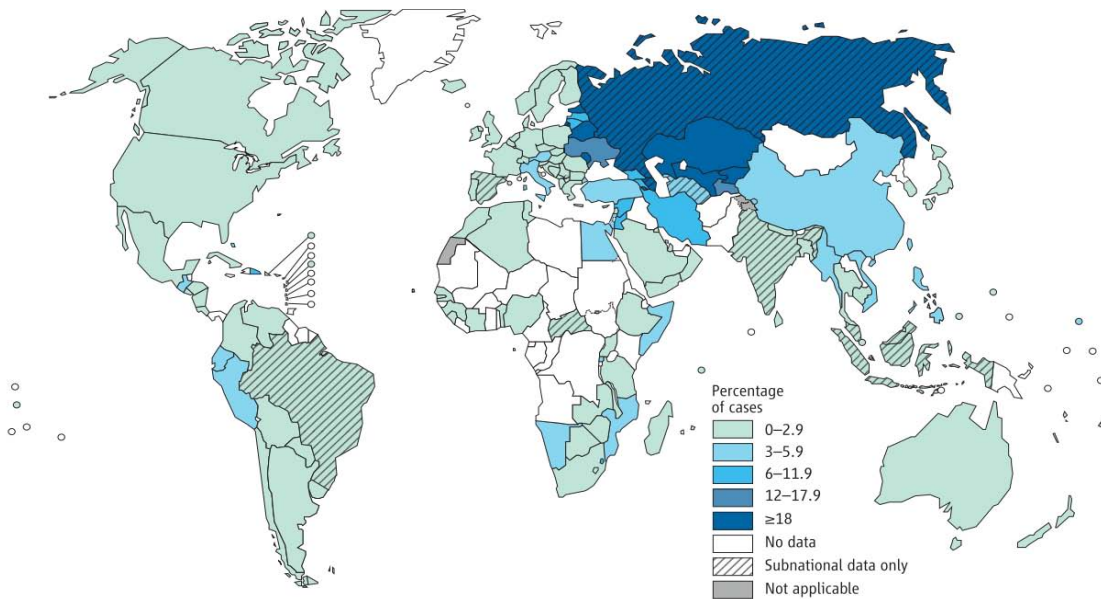


Figura 1. Porcentaje de casos nuevos de TB-MFR. (Tomada de Global Tuberculosis Report 2013.)

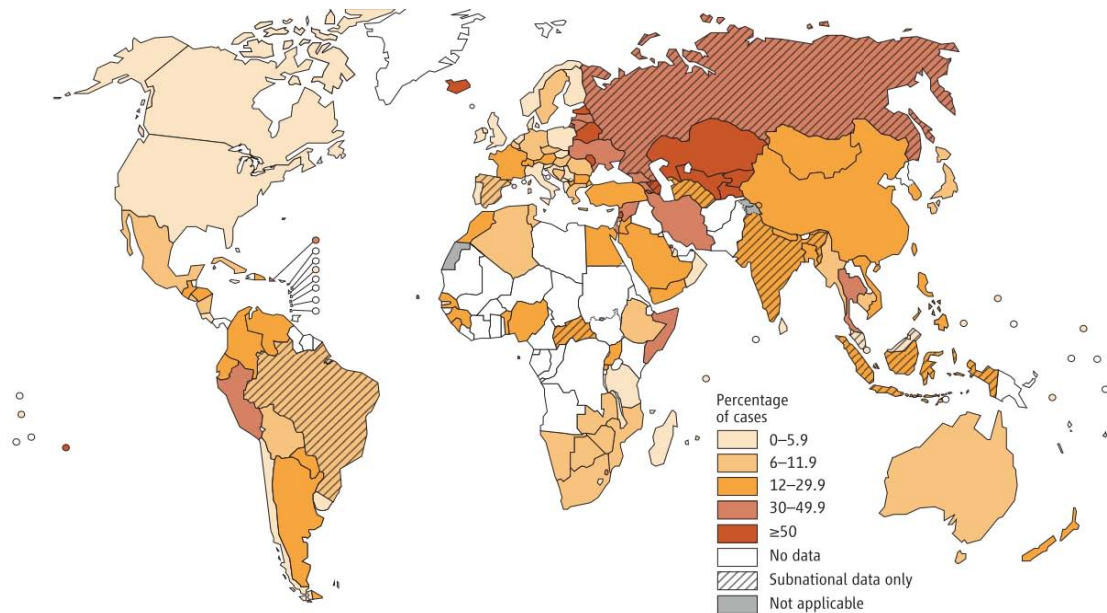


Figura 2. Porcentaje de casos con TB-MFR tratados previamente para TB. (Tomada de Global Tuberculosis Report 2013.)

Diagnóstico de TB-MFR.

Existen diversos métodos para diagnosticar la TB-MFR, como las pruebas de fármacosensibilidad (PFS), que son métodos fenotípicos que involucran el cultivo de *M.tuberculosis* en presencia de fármacos anti-tuberculosos para determinar la inhibición del crecimiento micobacteriano. Estos métodos se clasifican en pruebas en medio sólido directas e indirectas. Las directas utilizan medios con presencia de fármacos y libres de ellos, inoculados con la muestra del paciente. Los métodos indirectos involucran la inoculación con un cultivo puro de *M. tuberculosis*. Los métodos fenotípicos indirectos actualmente son el estándar de oro.(5)

El estándar de oro considerado para sensibilidad a Isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomycin, es el método de proporciones (descrito por Canetti y Grosset) que compara el número de colonias desarrolladas en medios con diferentes diluciones de antibióticos, respecto a las desarrolladas en los medios sin antibióticos, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco. El estándar de oro para la pirazinamida, es el método de Wayne que consiste en la detección de la enzima pirazinamidasa (enzima de *M. tuberculosis* que hidroliza la pirazinamida a

ácido pirazinoico, que es la forma activa de la pirazinamida contra la micobacteria; por lo tanto la presencia de la enzima indica que la cepa es sensible y su ausencia indica resistencia). (22)

También existen pruebas de óxido-reducción o colorimétricos, que se fundamentan en la reducción de un indicador añadido al medio de cultivo luego de que el bacilo es expuesto *in vitro* a diferentes antibióticos; detectando la resistencia con el cambio de color del indicador. Un ejemplo es el método de Griess, que se basa en la reducción del nitrato a nitrito, en el cultivo de *M.tuberculosis* en medio Löwenstein Jensen (LJ) al que se le añade NaNO_3 , que es usado como sustrato para evaluar la reducción del nitrato. Además, existen un método radiométrico BACTEC 460 que mide cuantitativamente el $^{14}\text{CO}_2$ producido durante el metabolismo del sustrato marcado con ^{14}C , este $^{14}\text{CO}_2$ es proporcional a la tasa de metabolismo y reproducción de las micobacterias presente en el medio.(5,22)

Además, existen los métodos genéticos, que determinan la resistencia identificando a los genes que le confieren resistencia a la micobacteria. En esos métodos primero se realiza la amplificación de un fragmento o región del cromosoma micobacteriano que puede estar alterado utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se hace la amplificación de productos de PCR caracterizados de manera específica para genes de resistencia, como es el caso de los genes *katG* e *inhA* para isoniazida y el gen *rpoB*, para rifampicina, respectivamente.(5) Un ejemplo de estos nuevos métodos es Xpert MTB/Rif aprobado por la OMS en el año 2010, que detecta simultáneamente la tuberculosis y mutaciones asociadas a resistencia a rifampicina directamente en la muestra de esputo del paciente en menos de dos horas, sin embargo tiene un costo elevado y no está disponible en todos los laboratorios.(23)

Tratamiento de TB-MFR.

El paciente con cepas resistentes a isoniazida y rifampicina no responde al tratamiento convencional de primera línea. La TB-MFR se puede curar y tratar con medicamentos de segunda línea (Tabla 2). Sin embargo, las opciones de tratamiento son limitadas y los

medicamentos no siempre están disponibles. Además de que el tratamiento es más prolongado, costoso y puede producir reacciones adversas graves.(10)

Actualmente el tratamiento estándar para TB-MFR es de 18-24 meses y debe constar de al menos cuatro medicamentos de eficacia demostrada o con alta probabilidad de ser eficaces. La dosis del medicamento se determina en función del peso corporal y se usa un medicamento inyectable (aminoglucósido o capreomicina) hasta 4 meses después de la negativización del cultivo, pero por un mínimo de 6 meses.(5)

Tabla 2. Medicamentos para el tratamiento de TB-MFR, por grupos y abreviatura. (Modificado de Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos.)(5)

| Grupos de medicamentos para el tratamiento de TB-MFR | |
|---|--|
| Grupo de medicamento | Medicamento (abreviatura) |
| Grupo 1. Antituberculosos orales de primera línea: | Etambutol (E) Pirazinamida (Z) |
| Grupo 2. Antituberculosos inyectables: | Estreptomina (S) Kanamicina (Km) Amikacina (Am) Capreomicina (Cm) |
| Grupo 3. Fluoroquinolonas: | Ofloxacino (Ofx) Levofloxacino (Lfx) Moxifloxacino (Mfx) |
| Grupo 4. Bacteriostáticos orales, antituberculosos de segunda línea | Etionamida (Eto) Protionamida (Pto) Cicloserina (Cs) Terizidona (Trd) Ácido p-aminosalicílico (PAS) |
| Grupo 5. Antituberculosos con eficacia poco clara (no recomendados por la OMS para uso en pacientes con TB-MFR): | Clofazimina (Cfz) Amoxicilina/clavulanato (Amx/Clv) Clarithromicina (Clr) Linezolid (Lzd) Tioacetazona (Th) Imipenem/cilostatin (Ipm/Cln) Dosis altas de isoniazida (high-dose H) Clarithromicina (Clr) |

Respuesta inmune contra *M. tuberculosis*.

La tuberculosis pulmonar activa solo se desarrolla en el 5-10% de las personas infectadas, mientras el 90% de las personas restantes son capaces de controlar la infección por medio de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa; sin embargo, la respuesta inmune que se induce durante la infección controla pero no elimina al patógeno y éste permanece en un estado de latencia. Los individuos con TB latente permanecen asintomáticos y no infecciosos, esta latencia clínica a menudo se extiende durante toda la vida. Sin embargo, la reactivación de la infección latente puede ocurrir en respuesta a cambios de la respuesta inmune como VIH, cáncer y diabetes mellitus, produciendo TB activa.(4,24)

El control de la TB por la respuesta inmune del hospedero se inicia cuando los bacilos de *M.tuberculosis* entran al cuerpo a través de la vía respiratoria donde la primera línea de defensa frente a la infección son los macrófagos alveolares éstos son los encargados de fagocitar y eliminar a *M.tuberculosis*. Sin embargo, la eliminación no es completa ya que algunos bacilos logran sobrevivir evadiendo la respuesta inmune del huésped. Los mecanismos que le permiten al bacilo sobrevivir dentro de los macrófagos alveolares incluyen: inhibir la función fagolisosomal, inhibición de la acidificación del fagosoma, inducir una disminución de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo II y además, *M.tuberculosis* es resistente a los mecanismos de destrucción mediados por reactivos intermediarios de oxígeno y nitrógeno.(25,26)

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 producción y liberación de citocinas que tienen un papel muy importante en la migración de diferentes poblaciones celulares al sitio de infección. Estas células como linfocitos, macrófagos y granulocitos, que amplifican la respuesta inflamatoria, posteriormente serán las encargadas de formar el granuloma característico de la infección por *M. tuberculosis*.(26,27)

Dentro de 2 a 6 semanas después de la infección la inmunidad mediada por células T se desarrolla y hay una afluencia de linfocitos y macrófagos activados que resulta en la formación del granuloma que es un agregado de células que evitan la diseminación de la bacteria por encapsulamiento evitando su diseminación, esto es un mecanismo de defensa para evitar la propagación de la infección y mantenerla en un estado de latencia.(26,28)

Células mediadoras de la respuesta inmune.

M.tuberculosis es un ejemplo clásico de patógeno para el cual la respuesta protectora está basada en la inmunidad mediada por células. Para controlar y eliminar la micobacteria se requiere por lo tanto de los mecanismos efectores de las células T. La respuesta adecuada de células T depende sobre todo del reconocimiento de antígenos específicos, que se presentan principalmente en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II.(24,26)

Linfocitos T CD4⁺

Son células importantes para el desarrollo de la respuesta inmune contra *M.tuberculosis*, como se ha demostrado en la infección del VIH que la pérdida de células T CD4⁺ aumenta en gran medida la susceptibilidad de desarrollar TB activa.(28)

Los linfocitos CD4⁺ reconocen antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas MHC II. Los antígenos micobacterianos inmunodominantes para las células T CD4⁺ son la proteína de 30/32 kDa, ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6), CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10), lipoproteínas de 19 y 38 kDa y dos proteínas de 32 kDa (proteasa de serina) y 39 kDa.(29)

La principal función efectora de las células T CD4⁺ es la producción de IFN- γ para activar a los macrófagos, los cuales controlan y/o eliminan a los microorganismos intracelulares. Se han descrito dos subgrupos de linfocitos T CD4⁺: las células Th1 productoras de citocinas pro-inflamatorias como el IFN- γ , TNF- α e IL-12 y las células Th2 productoras de citocinas anti-inflamatorias como: IL-4, IL-5 e IL-13. En la infección con *M.tuberculosis* la

respuesta Th1 es la más importante debido a que activa mecanismos efectores bactericidas de macrófagos infectados.(24)

Linfocitos T CD8⁺

Existen al parecer dos funciones efectoras primarias de las células T CD8⁺ en la TB, la lisis de células infectadas y la producción de citocinas. Las primeras se conocen como células citolíticas o citotóxicas que producen la lisis de células infectadas por *M.tuberculosis* produciendo perforinas y granulinas. Los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos en el contexto de moléculas del MHC I debido a que los antígenos micobacterianos tienen acceso a las moléculas de clase I por medio de la salida de *M.tuberculosis* del fagosoma hacia el citoplasma del macrófago. Los antígenos micobacterianos presentados a los linfocitos T CD8⁺ incluyen proteínas de choque térmico como la de 38 kDa, 65 kDa y proteína de 19 kDa y proteínas de secreción de la micobacteria como ESAT-6 y CFP-10.(24,25)

Reconocimiento de antígenos micobacterianos en el contexto CD1.

Las moléculas CD1 son moléculas presentadoras de antígenos no polimórficas, que tienen una similitud estructural con las moléculas de MHC clase I. Los CD 1 presentan lípidos y glicolípidos (fosfatidil inositol manósido, lipoarabinomananas, ácidos micólicos y hexosil-1- fosfoisoprenoides) a las células T CD8⁺ y células que no expresan en su membrana celular las moléculas CD4 y CD8, es decir dobles negativos (CD4⁻ y CD8⁻), aunque en la actualidad hay evidencia que también podría presentar antígenos a las células T CD4⁺.(25,26)

Células Polimorfonucleares (PMNs).

En TB el papel de las células polimorfonucleares (PMNs) ha recibido poca atención. En la inflamación infecciosa, las PMNs (principalmente neutrófilos) son los primeros fagocitos en llegar y tratar de eliminar a los patógenos invasores a través de mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. El primer mecanismo (dependiente de oxígeno) resultan en la generación de especies reactivas de oxígeno, mientras que el segundo mecanismo (independiente de oxígeno) refleja la capacidad de las PMNs a la degranulación, liberaran enzimas proteolíticas y oxidantes preformados. La degranulación

de los neutrófilos tiene como objetivo al patógeno, sin embargo, estas sustancias pueden causar la destrucción de las células vecinas y disolución del tejido. Por lo tanto, la regulación de la afluencia de los neutrófilos al sitio de infección es esencial para minimizar el daño.(30)

Las PMNs se han implicado en el control de las infecciones micobacterianas, pero no se sabe si estas células tienen funciones protectoras directas. Inicialmente estudios *in vitro* sugieren que los neutrófilos humanos son capaces de matar a *M. tuberculosis*. Sin embargo, estudios recientes no confirman estos resultados. Los estudios en humanos y en animales indican que los neutrófilos, pueden desempeñar un papel importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de citocinas y quimiocinas. Aunque esta función inmunomoduladora se ha demostrado para muchas infecciones intracelulares, incluyendo la TB, la naturaleza pleiótrica de mediadores deja sin resolver la contribución exacta de los neutrófilos a la patogénesis de la TB.(30)

Citocinas mediadoras de la respuesta inmune en TB.

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular expresadas y secretadas por varios tipos celulares principalmente por las del sistema inmune. Son esenciales para la comunicación intercelular, interactúan con receptores específicos en las células diana para mediar respuestas fisiológicas importantes tales como el crecimiento, la inmunidad, la inflamación y la hematopoyesis. Las alteraciones en la expresión de las citocinas están asociadas con condiciones patológicas como el cáncer, infecciones crónicas y enfermedades autoinmunes.(31)

Interferón Gamma (IFN- γ).

El IFN- γ , es una citocina clave en el control de la infección por *M. tuberculosis*, esta citocina es producida por los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, las células NK y NKT. Las personas con deficiencias en la producción de IFN- γ tienen mayor riesgo de padecer infecciones micobacterianas graves, incluyendo *M. tuberculosis*. El IFN- γ activa a los macrófagos para destruir los bacilos intracelulares a través de la expresión de la enzima

óxido nítrico sintetasa. Por otro lado, el IFN- γ aumenta la presentación de antígenos al inducir la expresión de moléculas del MHC I y II y de moléculas co-estimuladoras como: CD80 y CD86 que se unen a CD28, lo que conduce al reclutamiento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Aunque solo la producción de IFN- γ no es suficiente para el control de la infección por *M. tuberculosis*, su producción es esencial para inducir una respuesta protectora contra este patógeno. La producción de esta citocina varía entre cada individuo, sin embargo algunos estudios indican que los niveles en sangre periférica están disminuidos en pacientes con TB activa y que correlacionan con la extensión de la enfermedad a nivel pulmonar, es por ello que se ha sugerido como un biomarcador de la infección por *M. tuberculosis*.(25,28,32)

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

El TNF- α es producido por los macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. En pacientes con TB se ha encontrado tanto en el sitio de la enfermedad como a nivel sistémico. El TNF- α es responsable de efectos inflamatorios como la fiebre y la pérdida de peso que presentan los enfermos de TB. Los niveles elevados de TNF- α en plasma se han asociado con el deterioro clínico del paciente, mientras que la recuperación se asocia con una disminución del mismo. El TNF- α es necesario para el control de la infección aguda por *M.tuberculosis*, porque induce la producción de otras citocinas como IL-1 e IL-8 encargados de reclutar neutrófilos, en sinergia con el IFN- γ induce la apoptosis de macrófagos alveolares infectados. (25,28)

El TNF- α tiene un papel importante en la formación y mantenimiento del granuloma, éste cumulo de células contienen a *M.tuberculosis*, y por lo tanto previene la diseminación de la infección. Se ha demostrado en ratones, que en ausencia de TNF- α y/o su receptor la respuesta granulomatosa es ineficiente y provoca una muerte rápida con un gran número de bacilos, por otra parte los granulomas que se forman son desorganizados, con pocas células epiteliales alrededor y con linfocitos. La importancia del TNF- α para contener la infección latente en los granulomas se ha corroborado en el humano a partir del uso de fármacos anti-TNF como adalimumab e infliximab útiles en el manejo de enfermedades reumatológicas, en quienes se ha reactivado la infección latente por *M.tuberculosis*.(33)

Interleucina 12 (IL-12).

En TB, La IL-12 es producida después la fagocitosis de los bacilos de *M.tuberculosis* por los macrófagos y células dendríticas, la cual induce una respuesta Th1 con la producción de IFN- γ . El papel de la IL-12 en el control de la TB se observó en los ratones deficientes del gen IL-12p40, cuando estos ratones se infectan muestran un aumento en la carga bacteriana y una disminución del tiempo de supervivencia probablemente debido a la disminución en la producción de IFN- γ . Por otro lado, se ha observado que los pacientes que no producen IL-12p40 sufren enfermedad por BCG cuando reciben esa vacuna y algunos presentan infecciones por micobacterias ambientales. Por otro lado, los pacientes con mutaciones en IL-12B se caracterizan por la heterogeneidad y la severidad de infecciones. Además, en la mayoría de los casos, la producción deficiente de IFN- γ se debe a mutaciones en la cadena β 1 del receptor para IL-12 o a mutaciones en el gen que codifica para la IL-12. En niños con mutaciones en el gen IL-12p40 o en el receptor de IL-12 presentan una disminución o ausencia en la producción de IFN- γ por las células T y son incapaces de controlar infecciones con microorganismos de baja virulencia como BCG o *M. avium*.(24,25,28,34)

Interleucina 1 β (IL-1 β).

IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria clave en el control de la infección por *M.tuberculosis*. En ensayos in vitro con macrófagos diferenciados de monocitos y tratados con IL-1 β , se ha demostrado que IL-1 β inhibe el crecimiento intracelular de *M.tuberculosis*, este hallazgo muestra que la señalización de IL-1 β activa macrófagos para suprimir el crecimiento intracelular de las micobacterias. Además, los ratones deficientes de IL-1 α y β e IL-1Ra son más susceptibles a la infección por *M.tuberculosis* y mueren casi tan rápido como los ratones deficientes de IFN- γ . A pesar de la abundancia de datos sobre la importancia de IL-1 β en defensa contra la TB, el mecanismo molecular por el cual IL-1 β mejora la resistencia del huésped es desconocido.(35)

Receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra).

IL-1Ra es una proteína anti-inflamatoria que bloquea competitivamente la unión de IL-1 α e IL-1 β a sus receptores sin tener actividad agonista. Los macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis* producen IL-1Ra después de la producción de IL-1 como una medida auto-limitante para evitar una inflamación excesiva en los pulmones. Además, cuando hay una producción de IL-1Ra existe una disminución en la producción de IL-1, una citocina pro-inflamatoria. En pacientes con TB activa se ha reportado que los niveles en suero de IL-1Ra se encuentran más altos comparados con el grupo control.(36,37)

Interleucina 2 (IL-2).

La interleucina-2 (IL-2) es importante para la activación y proliferación de células T antígeno específicas ya que forma parte de las señales de activación durante la presentación de antígenos. También se ha reportado su papel en la formación de granulomas durante la infección por *M.tuberculosis*. En pacientes con TB se ha demostrado que la producción de IL-2 estimulada por antígenos específicos de *M.tuberculosis* es mayor en comparación con los controles sanos. (38)

Interleucina 6 (IL-6).

IL-6 tiene múltiples papeles en la respuesta del huésped hacia *M. tuberculosis*, incluyendo inflamación, hematopoyesis y diferenciación de células T. Se ha reportado un papel potencial de la IL-6 en la supresión de la respuesta de las células T. En ese estudio, se infectaron macrófagos con BCG y fueron incapaces de estimular las respuestas de células T a un antígeno no relacionado y este efecto pudo ser revertido parcialmente por la neutralización de la IL-6. En estudios en ratones deficientes de IL-6 se observó que después de una infección con dosis bajas de aerosol hay un aumento temprano en la carga bacteriana pulmonar, así como una disminución en la producción de IFN- γ , sugiriendo que la IL-6 es importante en la respuesta innata inicial al patógeno.(24)

Interleucina 8 (IL-8).

La interleucina 8 desempeña un papel clave en la mediación de las respuestas inflamatorias, está implicada en la patogénesis de enfermedades pulmonares agudas y crónicas, pues actúa como quimioatrayente para los neutrófilos, células T y monocitos y controla el tráfico de estas células al sitio de infección. En TB pulmonar, altos niveles de IL-8 en el fluido del lavado bronco-alveolar y en plasma correlacionan con un aumento en la mortalidad de los pacientes. La IL-8 es importante para el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, pero el exceso de neutrófilos puede causar daño tisular por la liberación de oxidantes y proteasa, y ser perjudicial para la respuesta inmune del huésped. Aunque *M.tuberculosis* estimula las células epiteliales del pulmón para producir IL-8, no se conocen los componentes bacterianos responsables de la inducción y los mecanismos subyacentes de la estimulación de IL-8. (39)

Interleucina 9 (IL-9).

La IL-9 está involucrada en la inflamación y en enfermedades inmunes. Se ha reportado que la IL-9 es importante para la inducción de la respuesta Th1 durante la infección con *M.tuberculosis* en pacientes con TB. Los pacientes con una respuesta Th1 hacia *M.tuberculosis* (altos respondedores), presentan concentraciones altas de IL-9 en comparación con aquellos con respuestas Th1 débiles (bajos respondedores). Por otro lado, también se ha reportado una correlación directa entre la producción de IL-9 e IFN- γ y la adición de IL-9 aumenta notablemente la secreción de IFN- γ ante el estímulo con *M.tuberculosis*. Por otro lado, la IL-9 inhibe la apoptosis de células productoras de IFN- γ inducida por *M. tuberculosis*.(40)

Interleucina 10 (IL-10).

La interleucina 10 es considerada una citocina anti-inflamatoria. Es producida por los macrófagos y células Th2 durante la infección por *M. tuberculosis*; posee propiedades inhibitorias en macrófagos; disminuye la producción de IL-12, que a su vez disminuye la producción de IFN- γ por células T; e inhibe la respuesta de células T CD4⁺ y la función de células presentadoras de antígenos infectadas con micobacterias.(28)

Interleucina 17 (IL-17).

IL-17 es una citocina producida por células dendríticas, macrófagos, células epiteliales, linfocitos, queratinocitos y fibroblastos. IL-17 induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-8 y G-CSF y proteínas antimicrobianas como defensinas, además participa en la granulopoyesis y el reclutamiento de neutrófilos en TB activa. Se ha demostrado que la IL-17 tiene un papel importante en la inmunidad inducida por vacunación con BCG y cepas virulentas de *M.tuberculosis* como la HN878.(41) La IL-17 puede tener efectos beneficiosos, mediante el reclutamiento de neutrófilos y promover la secreción de citocinas, pero una extensa exposición de los neutrófilos a IL-17 puede hacer que estas células sobrevivan más tiempo, cambien su fenotipo y causen inmunopatología.(42)

Interleucina 7 (IL-7) e Interleucina 15 (IL-15).

La IL-7 es una citocina que actúa sobre los progenitores linfoides inmaduros, induciendo su desarrollo, es importante para el desarrollo y diferenciación de células B y T. La IL-7, es una citoquina secretada por las células del estroma que es crítica para el desarrollo, la proliferación homeostática y la supervivencia de las células T vírgenes. Además, se ha demostrado que apoya el crecimiento y desarrollo de células pre-B y pro-B.(43,44) La IL-15 es una citocina secretada por células como monocitos, macrófagos y células dendríticas, regula la activación y proliferación de células T y NK. Además, en los seres humanos con enfermedad celíaca IL-15 suprime la apoptosis en los linfocitos T mediante la inducción de Bcl-2 y/o Bcl-xL.(45)

El papel de IL-7 e IL-15 en TB no se ha investigado detalladamente, Maeurer y colaboradores encontraron que IL-7 e IL-15 son capaces de aumentar la supervivencia de ratones infectados con *M. tuberculosis*, estos efectos solo se observan exclusivamente cuando las citocinas se aplican en un entorno de tratamiento (3 semanas después de la infección), pero no cuando son administradas en el momento de la infección. La supervivencia de los animales infectados con *M.tuberculosis*, pueden ser explicados por diversos mecanismos, por ejemplo, la activación de distintos subconjuntos de linfocitos T, la activación de monocitos / macrófagos y la modulación del entorno de citocinas.(46)

Citocinas producidas en respuesta Th2: Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5) e Interleucina 13 (IL-13) .

La importancia de la respuesta de células Th2 productoras de IL-4, IL-5 e IL-13 es un tema de controversia en TB. La detección de IL-4 e IL 13 es variable y aunque algunos estudios indican que existen varias respuestas Th2 en la infección con *M. tuberculosis*, esto no ha sido demostrado. En humanos se observó que existe una respuesta inmune Th1 disminuida pero sin incremento en una respuesta Th2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes tuberculosos. La elevada expresión de IFN- γ se detectó en granulomas dentro de nódulos linfáticos de pacientes con linfadenitis tuberculosa, pero se detectó poca cantidad de mRNA de IL-4. Estos resultados indican que al parecer en humanos no existe una respuesta Th2 asociada a la TB.(24) IL-5 es una citocina que actúa como factor de crecimiento y diferenciación para células B y eosinófilos, juega un papel importante en la maduración, reclutamiento y supervivencia de los eosinófilos. El aumento en la producción de esta citocina puede estar relacionado con la patogénesis de enfermedades inflamatorias dependientes de eosinófilos. El papel de IL-5 en TB no se ha estudiado con profundidad, sin embargo algunos reportes indican que las personas con TB y diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) presentan una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias, así como IL-5 e IL-10.(47) La IL-13 es una citocina producida por los linfocitos Th2, su principal su principal papel está relacionado con las funciones citotóxicas e inflamatorias de los monocitos/macrófagos y ejerce una función en el control de la inmunorreactividad de los linfocitos B (potencia la expresión de CD-23, MHC II e induce la síntesis de Ig-E e Ig-G).(48) De igual forma que la IL-5, el papel de IL-13 en TB no se ha estudiado con profundidad. Sin embargo, se ha observado que los pacientes con TB activa tienen una mayor concentración de IL-13 en suero en comparación con pacientes que presentan una patología producida por micobacterias no tuberculosas.(49)

Eotaxina.

La eotaxina o CXCL 8 es una citocina con actividad quimiotáctica específica para eosinófilos. Los efectos de la eotaxina sobre los eosinófilos incluyen quimotaxis, migración transendotelial, inducción y liberación de especies reactivas de oxígeno. Además se ha propuesto que la eotaxina coopera con la IL-5 para reclutar eosinófilos al sitio de

inflamación: IL-5 estimula la liberación y diferenciación de los eosinófilos en la médula ósea, y la eotaxina dirige la migración de estas células circulantes a su destino local. Por otro lado, la eotaxina ejerce actividad quimiotáctica para basófilos y linfocitos Th2. (50) En pacientes con TB se ha observado que la concentración de eotaxina es significativamente menor antes de comenzar el tratamiento en comparación con los controles. En los pacientes con TB activa los niveles de eotaxina aumentaron progresivamente y de manera significativa durante el tratamiento en comparación con los niveles previos al tratamiento.(51)

Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico (FGF-Basic).

El FGF tiene un papel importante en el proceso de cicatrización de heridas y es un potente inductor de la angiogénesis. En pacientes con TB se ha estudiado la concentración de FGF-básico en el plasma, sin embargo los niveles de concentración son variables a lo largo del tratamiento y el papel en la respuesta inmune hacia *M.tuberculosis* se desconoce.(52)

Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF).

El G-CSF es una citocina que controla la diferenciación hematopoyética y función de los granulocitos. El G-CSF es el regulador más importante de la producción de granulocitos. G-CSF también se ha demostrado que modula la función de los neutrófilos maduros tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo la supervivencia, la quimiotaxis, la expresión de moléculas de adhesión y la actividad fagocítica. G-CSF es producido por monocitos/macrófagos y linfocitos tras la activación por lipopolisacáridos (LPS), TNF- α e IFN- γ . Otras células que no son del sistema inmune también producen G-CSF como los fibroblastos, células endoteliales, astrocitos y células estromales de médula ósea, en respuesta a estímulos como LPS, IL-1 y TNF- α . (53)

Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF).

GM-CSF induce la regulación de moléculas del MHC clase II y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 en células presentadoras de antígenos (APC), y aumenta su actividad

fagocítica. Particularmente en los pulmones, GM-CSF es importante para la diferenciación y maduración de los macrófagos y la inducción de la respuesta Th1. (54)

Proteína 10 Inducible por IFN- γ (IP-10).

La IP-10 es producida por varios tipos de células incluyendo monocitos, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. La expresión de IP-10 es inducida principalmente por el IFN- γ , pero también por otras citocinas como la IL-2, IFN- α , IFN- β , IL-27, IL-17, IL-23, TNF- α e IL-1 β . IP-10 funciona como un quimioatrayente de monocitos y células T en sitios con inflamación, se ha observado que su nivel en plasma aumenta en pacientes con TB activa y se reduce significativamente en el éxito al tratamiento antituberculoso.(38)

Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1 (MCP-1).

MCP-1 tiene un papel importante en la patogénesis de la TB porque promueve la quimiotaxis y/o la migración de células mononucleares, que son componentes esenciales en la respuesta granulomatosa (respuesta inmune celular que trata de contener y aislar un agente dañino que es difícil erradicar. Normalmente produce la activación de células T que inducen a su vez la activación de los macrófagos, dando como resultado la formación de granulomas). En humanos, la concentración de MCP-1 en lavado bronco-alveolar de pacientes con TB pulmonar se encuentra elevada y disminuye después de una terapia exitosa. En pacientes con TB los macrófagos son la fuente principal de MCP-1.(55)

Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 α (MIP-1 α) y 1 β (MIP-1 β).

MIP-1 α y MIP-1 β , son fundamentales en la infección por *M. tuberculosis*, ya que inducen la proliferación y activación de células T y macrófagos, MIP-1 α promueve la diferenciación de células Th1 e induce la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, mientras que MIP-1 β puede modular la producción de TNF- α inducida por MIP-1 α . Se ha reportado que MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES aumenta la fagocitosis y la muerte de *Trypanosoma cruzi* un organismo intracelular. Saukkonen y cols. encontraron que MIP-1 β y RANTES suprimen el crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos.(56)

Proteína reguladora en la activación, expresada y secretada por células T (CCL5 / RANTES).

CCL5 o RANTES es una quimiocina producida por una amplia variedad de tipos de celulares, incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, plaquetas y las células epiteliales. Además de sus propiedades quimiotácticas para eosinófilos, basófilos, mastocitos y fagocitos mononucleares, se ha demostrado que induce la proliferación y activación de células T y macrófagos. Algunos reportes demuestran que RANTES ayuda a la formación del granuloma y suprimen el crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos.(56,57)

Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas $\beta\beta$ (PDGF- $\beta\beta$).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas es un importante regulador de la reparación de tejidos, angiogénesis, proliferación y migración celular, pero puede producir inflamación y fibrosis cuando está presente en grandes cantidades. Hay evidencia que PDGF- $\beta\beta$ y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) están implicados en la inflamación crónica y fibrosis en pacientes con TB o sarcoidosis. Además PDGF- $\beta\beta$ es quimiotáctico y estimula la proliferación de fibroblastos. El IFN- γ induce la expresión de mRNA PDGF- $\beta\beta$ en macrófagos alveolares (58)

Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF).

VEGF es una citocina multifuncional que contribuye a la angiogénesis y la inflamación. Se asocia a enfermedades inflamatorias y en pacientes con TB pulmonar se ha reportado que los niveles en suero de VEGF se encuentran aumentados al inicio del tratamiento y disminuyen significativamente durante el curso del tratamiento anti-tuberculosis. (52)

Biomarcadores en Tuberculosis.

Un marcador biológico o biomarcador se define como cualquier molécula que puede ser objetivamente medida y evaluada como indicadora de un proceso biológico normal, un proceso patogénico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica; es decir, toda señal accesible y cuantificable que informa acerca del estado de salud de un sistema biológico. Esta señal puede consistir en una molécula circulante o una expresión genética.

Además de ser medible, un biomarcador debe poseer un grado suficiente de especificidad-sensibilidad y ser susceptible de análisis estadístico y tener un precio razonable.(59) Las citocinas como moléculas clave que regulan las respuestas inmunológicas, se han estudiado como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la TB.(60)

El seguimiento de la eficacia del tratamiento en los caso de TB-MFR es difícil, costoso y con una eficacia entre 50-65%. De acuerdo con la OMS, para el seguimiento del tratamiento se recomienda realizar baciloscopías mensuales, La baciloscopía es una guía importante para evaluar la respuesta terapéutica, pero no siempre resulta lo suficientemente sensible para detectar una población escasa de bacilos, además de que puede detectar bacilos no viables dando una idea falsa de falla farmacológica. Por lo que el cultivo es considerado como el estándar de oro para el diagnóstico y el criterio de curación. Aunque es un método limitado por las características de lento crecimiento de *M. tuberculosis*, lo que imposibilita hacer cambios oportunos en el régimen de tratamiento, en el caso de ser requerido.(8) Por tal motivo existe la necesidad de identificar biomarcadores fiables que indiquen o sean capaces de predecir los diferentes resultados clínicos de la infección por *M. tuberculosis*. Hasta el momento se carece de un biomarcador como herramienta de diagnóstico, pronóstico, cambios terapéuticos y evaluación de vacunas contra la TB.(60)

Actualmente hay varias investigaciones de biomarcadores que podrían ser utilizados para indicar una infección por *M. tuberculosis*, se ha descrito que IP-10 y VEGF pueden ser marcadores útiles en el seguimiento de la TB y la eficacia del tratamiento, pues se ha observado que los nivel en plasma de IP-10 y VEGF aumenta en pacientes con TB activa y reduce significativamente en el éxito al tratamiento antituberculoso.(38,52)

Ruhwald y colaboradores proponen a IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, y a IL-1Ra como posibles biomarcadores de diagnóstico en la infección por *M. tuberculosis*; en su investigación encontraron que los pacientes con TB activa presentan una mayor concentración de IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3 e IL-1Ra en el sobrenadante de sangre completa estimulada con ESAT-6, CFP10 y TB 7.7 (antígenos específicos de *M. tuberculosis*), en comparación con el grupo control.(61) Las citocinas pro-inflamatorias

como el TNF- α , IL-12 (p40) e IL-17 se incrementan en los casos de TB activa y pueden discriminar la enfermedad activa de la infección latente.(60) Los pacientes con TB muestran altos niveles en suero de IL-8, IP-10, MCP-1 y MIP-1 β respecto al grupo control. (60)

Carrera *et al.* realizó un estudio basado en ELISPOT que promete ser un marcador sustituto de la carga bacteriana para monitorear la respuesta al tratamiento de la TB. Los autores encontraron una correlación entre la frecuencia de células T antígeno específicas a lo largo del tratamiento con la respuesta al tratamiento clínica y bacteriológica, cuando el cultivo se vuelve negativo la frecuencia de células T productoras de IFN- γ disminuye. Los resultados sugieren una relación cuantitativa entre las células T, la carga antigénica y carga bacteriana. En este estudio sugieren que esto podría ser especialmente útil para nuevas intervenciones farmacológicas o inmunológicas para el tratamiento de TB-MFR, debido a que la respuesta al tratamiento y la disminución de la carga bacteriana son mucho más lentas y más difíciles de predecir.(62)

En TB-MFR no existen estudios específicos sobre biomarcadores, Geffner y colaboradores estimularon PBMCs con cepas de *M. tuberculosis* (H37RV y dos cepas multi-resistentes) de pacientes con TB-MFR y TB fármaco sensible y encontraron que los pacientes con TB-MFR producen más IL-10, sin embargo las diferencias no fueron significativas. (63) Se cree que los pacientes con TB-MDR generalmente presentan una respuesta inmune diferente en comparación con pacientes de TB no resistente. Por ejemplo, los niveles de TNF- α e IL-1 α , y los linfocitos CD4 evaluados por ELISA en sangre periférica son más bajos en la TB-MFR que en los pacientes con TB. Además la producción de IFN- γ parece verse afectada en PBMC estimuladas con ESAT-6, Ag85B y PPD en comparación con pacientes con TB y los controles.(64) Debido a que no se cuenta con estudios previos de biomarcadores que evalúen la respuesta al tratamiento en pacientes con TB-MFR, en esta tesis se evaluaron 27 moléculas solubles en suero de pacientes con diagnóstico de TB-MFR en la búsqueda de biomarcadores de eficacia al tratamiento, durante el periodo 2010-2013 con el ensayo multiplex de Bio-Plex.

Justificación.

La tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública en México y su control se ha complicado con la aparición de cepas multi-fármaco resistentes (TB-MRF). Los pacientes con tuberculosis multi-fármaco resistente (TB-MRF) reciben tratamiento con fármacos de segunda línea, el diagnóstico y criterio de curación es principalmente bacteriológico, sin embargo, la baciloscopía tiene deficiencias, ya que no es suficientemente sensible para detectar poblaciones escasas y no es capaz de predecir si los bacilos en la muestra son viables y aunque el cultivo es la mejor forma de evaluar estos parámetros su uso es limitado en el seguimiento del tratamiento, lo que repercute en pérdida de tiempo para tomar decisiones terapéuticas que podrían beneficiar a los pacientes.

Hasta el día de hoy no se cuenta con una técnica efectiva que monitoree la eficacia del tratamiento anti-tuberculosis en pacientes con TB-MFR que permitan realizar ajustes en los fármacos para incrementar el éxito del tratamiento, por ello es importante implementar técnicas alternativas de inmunodiagnóstico basadas en biomarcadores útiles en la valoración de la eficacia al tratamiento anti-tuberculosis.

Hipótesis.

Las concentraciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de pacientes con TB-MFR cambiarán significativamente después una terapia exitosa debido a la disminución de la carga bacteriana, lo que permitirá su aplicación como biomarcador.

Objetivo general.

- Identificar biomarcadores solubles que permitan valorar la eficacia al tratamiento en suero de pacientes con TB-MFR.

Objetivos particulares.

- Comparar las concentraciones de IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxina, FGF-Basic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , PDGF- $\beta\beta$, MIP-1 β , RANTES, TNF- α y VEGF en el suero de pacientes con TB-MFR antes (0 meses) y durante el tratamiento (3, 6-7, 11-12 y 24-25 meses) para conocer su comportamiento.
- Comparar las concentraciones de cada molécula antes del tratamiento con la concentración detectada al tiempo de conversión del cultivo a negativo para identificar biomarcadores tempranos de respuesta al tratamiento.
- Analizar el comportamiento de cada molécula a lo largo del tiempo, desde el inicio hasta el final del tratamiento para identificar biomarcadores de eficacia

Métodos.

Este Protocolo fue aprobado por el comité de Ciencia y Ética del INER con número de proyecto C15-12.

Grupo de estudio.

En la Clínica de Tuberculosis del INER se reclutaron 29 pacientes con diagnóstico de TB-MFR confirmada bacteriológicamente que cumplieron con los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión.

- Pacientes con TB-MFR confirmada bacteriológicamente con baciloscopía y cultivo de *M.tuberculosis* en cuyas pruebas de susceptibilidad exista resistencia a rifampicina e isoniazida.
- Pacientes que reciban tratamiento con fármacos de segunda línea con base en la estrategia TAES (tratamiento acordado estrictamente supervisado) propuesto por la OMS.
- Pacientes mayores de 18 años y menores de 70 años.
- Prueba de VIH por ELISA negativo.
- Pacientes cuyo lugar de residencia les permita acudir mensualmente a las evaluaciones.
- Pacientes que otorguen su consentimiento informado por escrito.

2. Criterios de exclusión.

- 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).
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con alcoholismo o adictos a algún tipo de droga.
- Indigentes

- Pacientes que por su comorbilidad o complicaciones relacionadas a la TB su expectativa de vida no sea mayor a un año.

3. Criterios de eliminación.

- Pérdida de seguimiento.
- Abandono o muerte en cualquiera de las fases del estudio.

Muestras biológicas.

Se obtuvieron muestras de esputo que fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de bacteriología en la búsqueda de BAAR y 5 ml de sangre periférica por flebotomía en Tubos sin anticoagulante BD Vacutainer SST (BS, N.J USA) para separar suero antes, durante y al finalizar el tratamiento (0, 1, 3, 6-7, 11-12 y 24-25 meses) en 29 pacientes con TB-MFR.

Separación de suero.

La muestra de sangre, se utilizó para separar el suero centrifugando el tubo BD Vacutainer a una velocidad de 2500 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la centrifugación se verificó que el gel separador estuviera entre el suero y la sangre. Se transfirió el suero en dos crioviales en partes iguales, se etiquetaron y se congelaron a -80 °C hasta el momento de utilizarse.

Ensayo multiplex con Bio-Plex.

Un día previo al ensayo se seleccionaron las muestras de suero, las cuales fueron descongeladas a temperatura ambiente, posteriormente se tomaron 200µl de cada vial con suero y se colocaron en una placa de 96 pozos (200µl de suero/pozo) y se almacenó en el refrigerador hasta su posterior utilización.

Antes de iniciar el ensayo se colocaron los reactivos del ensayo a temperatura ambiente (30 minutos), después se reconstituyó el vial de estándares en 500 µl del diluyente estándar Bio-Plex, se colocó en el vortex y se incubó 30 minutos en hielo. Se preparó la curva patrón

de 9 puntos y el blanco (solo 150 μ l de diluyente estándar), añadiendo 72 μ l de diluyente estándar en un tubo de 1.5 ml (tubo S1) y 150 μ l a los tubos (1.5 ml) S2 a S9 y al tubo de blanco, después se transfirieron 128 μ l del reconstituido estándar al tubo S1. A continuación se diluyó en serie de 4 veces de S1 hasta S9 mediante la transferencia de 50 μ l entre los tubos. Se dio Vortex entre las transferencias.

Se preparó 1X de perlas magnéticas con el buffer de ensayo, adicionando 575 μ l de perlas (10x) a 5,175 μ l buffer, una vez preparada la curva y las perlas magnéticas se corrió el ensayo.

Se colocaron 50 μ l de perlas a cada pozo de la placa de fondo plano y se lavó 2 veces con 100 μ l de buffer de lavado, después se añadieron 50 μ l de estándares (por duplicado, desde el tubo S1 a S9), 50 μ l blanco (por duplicado) y 50 μ l de suero, en seguida se cubrió suavemente la placa con una nueva hoja de cinta de sellado (para evitar contaminación de la placa), después se cubrió con papel aluminio para evitar fotoblanqueo y se incubó colocando la placa en un agitador mecánico por 30 minutos a una velocidad de 300 revoluciones por minuto (RPM) a temperatura ambiente. 10 minutos antes de terminar la incubación se preparó 1X del anticuerpo de detección a partir de un stock 10X de anticuerpo de detección en el diluyente del anticuerpo de detección adicionando 300 μ l de anticuerpo a 2,700 μ l de diluyente, una vez que terminó la incubación se lavó la placa 3 veces con 100 μ l de buffer de lavado.

Después se añadieron 25 μ l de anticuerpo de detección a cada pozo y nuevamente se cubrió suavemente la placa con una nueva hoja de cinta de sellado y se cubrió con papel aluminio, se incubó en un agitador mecánico 30 minutos a una velocidad de 300 RPM a temperatura ambiente. En seguida se preparó 1X de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) de un stock 100X Añadiendo 60 μ l SA-PE a 5940 μ l de buffer de ensayo y se cubrió de la luz; una vez que terminaron los 30 minutos de incubación se lavó la placa 3 veces con 100 μ l de buffer de lavado.

Se adicionaron 50 µl de estreptavidina-PE a cada pozo, se cubrió e incubó en un agitador mecánico durante 10 minutos a 300 RPM a temperatura ambiente y después se lavó la placa 3 veces con 100 µl de buffer de lavado. Se re-suspendieron las perlas en 125 µl de buffer de ensayo, y se agitó a 1100 RPM durante 30 segundos y se leyó la placa en el sistema Bio-Plex 200.

Nota: todos los lavados se realizaron en la estación de lavado Bio-Plex Pro II (Bio-Plex Pro II wash station)

Adquisición de datos.

Los datos de las reacciones fueron adquiridos utilizando el sistema Bio-Plex 200, donde un láser rojo (635 nm) ilumina cada perla fluorescente para proporcionar la clasificación y la identificación de las perlas. Al mismo tiempo, un láser verde (532 nm) excita la PE para generar una señal reportera que se detecta mediante un tubo fotomultiplicador (PMT). Un procesador digital de alta velocidad gestiona la salida de datos y el software de Bio-Plex Manager™ presenta los datos como Intensidad media de fluorescencia (MFI), así como la concentración (pg / ml) referida a cada curva de calibración.

Análisis de datos.

Para el análisis estadístico de todos los datos se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.0 e IBM SPSS Statistics versión 21.0. Se realizó un ANOVA de una vía y una prueba de Dunn's Multiple Comparison Test para analizar los cambios en los niveles de citocinas de pacientes con TB-MFR antes, durante y al finalizar el tratamiento. La diferencia entre tiempos se realizó con dos pruebas, la prueba estadística Wilcoxon Signed Rank Test (GraphPad Prism 5.0) y la prueba de rangos de Wilcoxon (IBM SPSS Statistics 21.0), en todas las pruebas una $P \leq 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.

Resultados.

Características clínicas y demográficas de los pacientes con TB-MFR.

El seguimiento del tratamiento en pacientes con TB-MFR se realizó de acuerdo a las indicaciones de la OMS, es decir se realizó cultivo para *M.tuberculosis* y baciloscopia mensualmente hasta la conversión o negativización (la negativización se define como 2 baciloscopias y cultivos negativos consecutivamente tomados en un intervalo de 30 días). Después de la negativización la frecuencia mínima recomendada para el control bacteriológico es mensual para la baciloscopia y trimestral para el cultivo.(1)

Durante el periodo 2010-2013 fueron incluidos 29 pacientes con TB-MFR, de los cuales 14 terminaron tratamiento, 5 abandonaron el estudio o tratamiento, 4 pacientes fallecieron durante el seguimiento, 3 siguen en tratamiento, 2 fueron transferidos y un paciente fracasó.

El presente trabajo se enfocó en el análisis de 12 pacientes que concluyeron el tratamiento exitosamente. La frecuencia fue mayor en el sexo masculino 5:1, con una mediana de edad de 48 años, el 50% de los pacientes tenían como comorbilidad Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) con un tiempo promedio de evolución de 9 años (tabla 3). El tratamiento fue con fármacos de segunda línea bajo un esquema estandarizado en 9 pacientes y con un esquema individualizado en 3, aproximadamente durante 24 meses.

Tabla 3. Características demográficas de los pacientes con TB-MFR.

| CARACTERÍSTICAS. | | n=12 |
|--|--------------|-------------|
| Género | Hombre | 10 (83.33%) |
| | Mujer | 2 (16.66%) |
| Edad (mediana) | Hombre | 46 (21-70) |
| | Mujer | 40 (19-61) |
| Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) | Hombre | 5 (41.66%) |
| | Mujer | 1 (8.33 %) |
| Serología para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) | Negativa | 9 (75%) |
| | No realizada | 3 (25%) |

Los tiempos a los cuales se analizaron las moléculas solubles en el suero de los pacientes con TB-MFR se muestran en la Figura 3. Donde el porcentaje de los pacientes que tenían asociada la DM2 se muestra en la parte superior de cada barra. Como puede observarse al final del tratamiento el número de pacientes disminuyó por distintos factores como que los pacientes no acude periódicamente a su cita con el médico especialista o las muestras de suero no coinciden con el tiempo analizado.

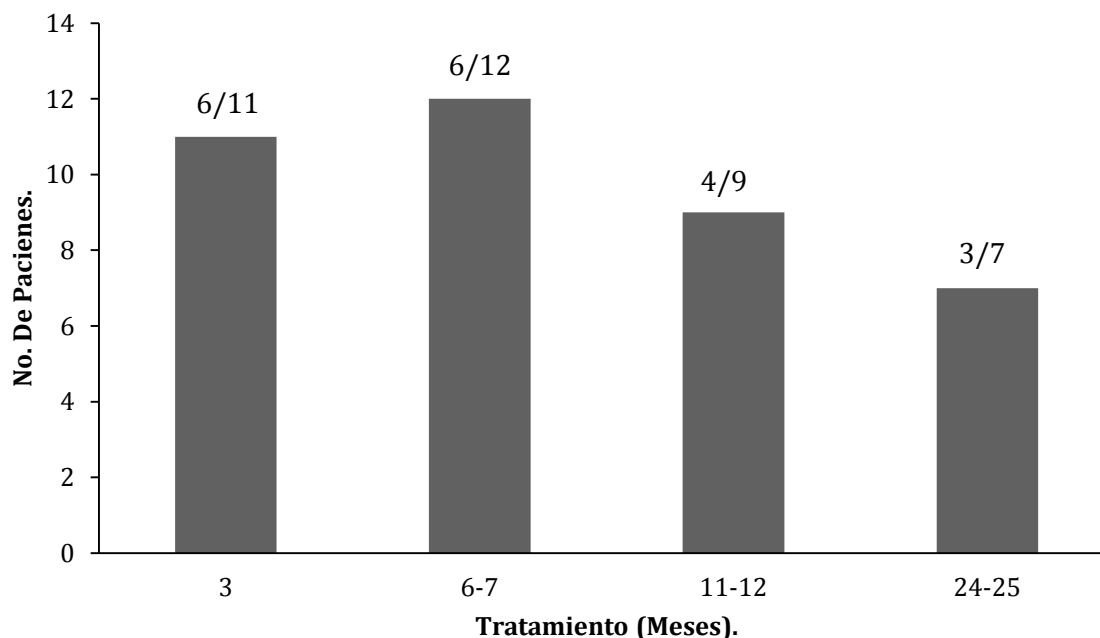


Figura 3. Numero de pacientes analizados en cada etapa del tratamiento. M: Meses.

A todos los pacientes con TB-MFR se les hizo cultivo para *M. tuberculosis* de muestras de esputo (Fig. 4a) y baciloscopía (Fig. 4b), que negativizarón en distintos tiempos del estudio. Sin embargo un paciente dio positivo en la baciloscopía a lo largo de todo el tratamiento. Cabe mencionar que al final todos los pacientes tratados fueron diagnosticados como curados

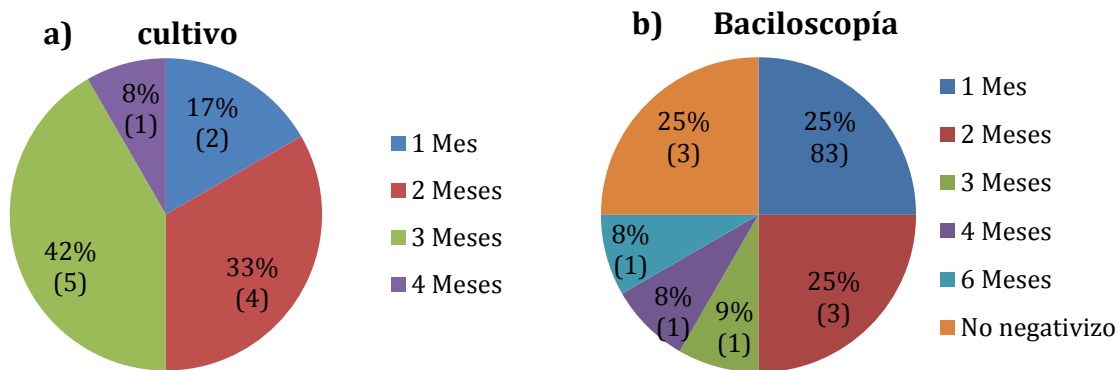


Figura 4. Tiempo de negativización. a) Cultivo y b) Baciloscopia para *M. tuberculosis* pacientes con TB-MFR. (n=12)

Biomoléculas de respuesta temprana al tratamiento en pacientes con TB-MFR

La respuesta temprana en pacientes con TB-MFR se realizó cuantificando 27 moléculas en dos tiempos de tratamiento (3 y 6-7 meses).

Las concentraciones de IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- γ y G-CSF disminuyeron significativamente ($p \leq 0.05$) (Figura 5 a-f,) mientras que la concentración de eotaxina aumentó significativamente a este mismo tiempo (Figura 5 g). Al hacer la misma evaluación a los 6-7 meses de tratamiento IL-1ra, IL-4, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- γ , FGF-Básico, G-CSF, IP-10 y VEGF mostraron una disminución significativa (Figura 6 a-n). En tanto que MCP-1 y la eotaxina incrementaron significativamente, también significativo (Figura 6 o-p).

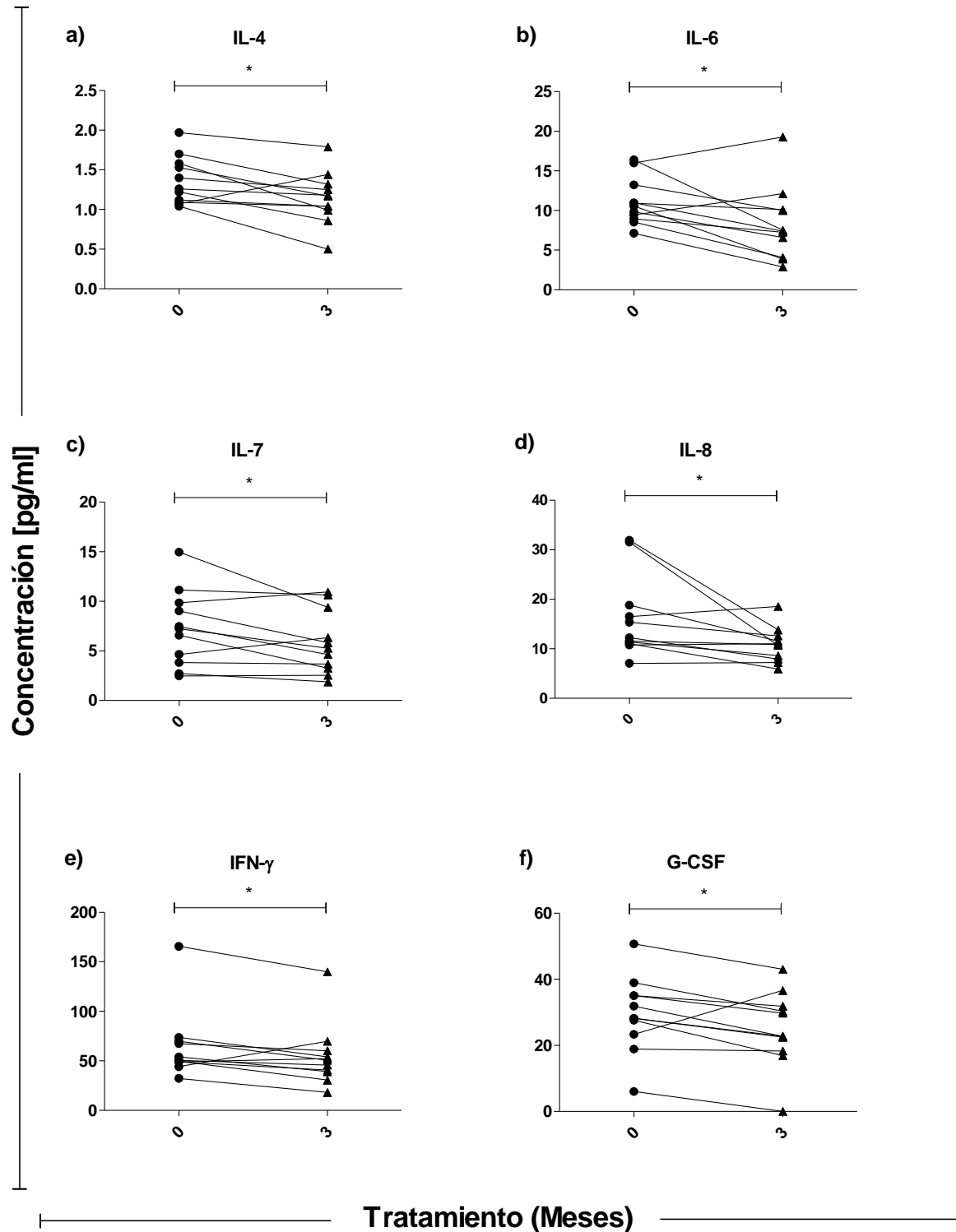


Figura 5. Perfil de citocinas a los 3 meses de tratamiento en suero de pacientes con tuberculosis multi-farmaco resistente (TB-MFR). Se determinó la concentración [pg/ml] de a) IL-4, b) IL-6, c) IL-7, d) IL-8, e) IFN- γ , f) G-CSF y g) Eotaxina de pacientes con TB-MFR (n=11), antes del tratamiento (0 meses) y a los 3 meses de tratamiento (3 meses). La diferencia entre tiempos se realizó con la prueba estadística Wilcoxon Signed Rank Test, considerando diferencia significativa una $P \leq 0.05$. * Diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento ($P \leq 0.05$).

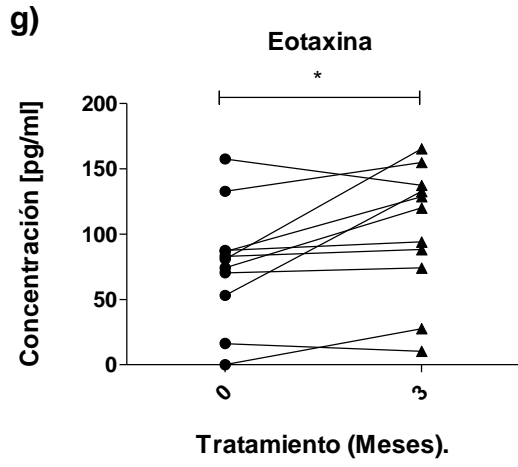


Figura 5. Continuación

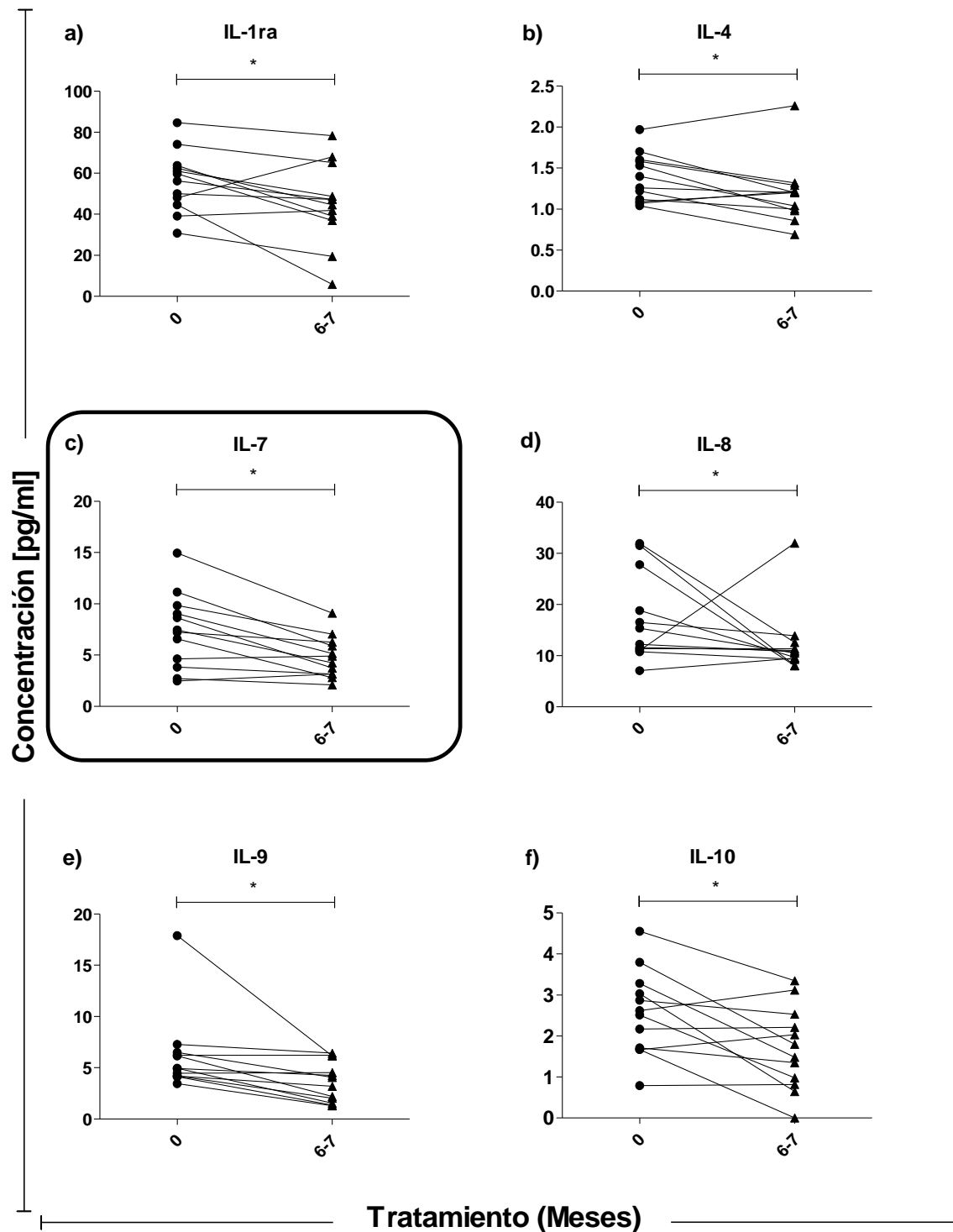


Figura 6. Perfil de citocinas a los 6-7 meses de tratamiento en suero de pacientes con tuberculosis multifarmaco resistente (TB-MFR). Concentración [pg/ml] de a) IL-1ra, b) IL-4, c) IL-7, d) IL-8, e) IL-9, f) IL-10, g) IL-12, h) IL-13, i) IL-15, j) IFN- γ , k) FGF-Básico, l) G-CSF, m) IP-10, n) VEGF, o) MCP-1 y p) Eotaxina de pacientes con TB-MFR (n=12), antes del tratamiento (0 meses) y al medio año de tratamiento (6-7 meses). La diferencia entre tiempos se realizó con la prueba estadística Wilcoxon Signed Rank Test, considerando diferencia significativa una $P \leq 0.05$. * Diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento ($P \leq 0.05$). Las gráficas que están dentro de un cuadro son las citocinas que presentan diferencia significativa cuando se excluye a los pacientes con TB-MFR Y DM2.

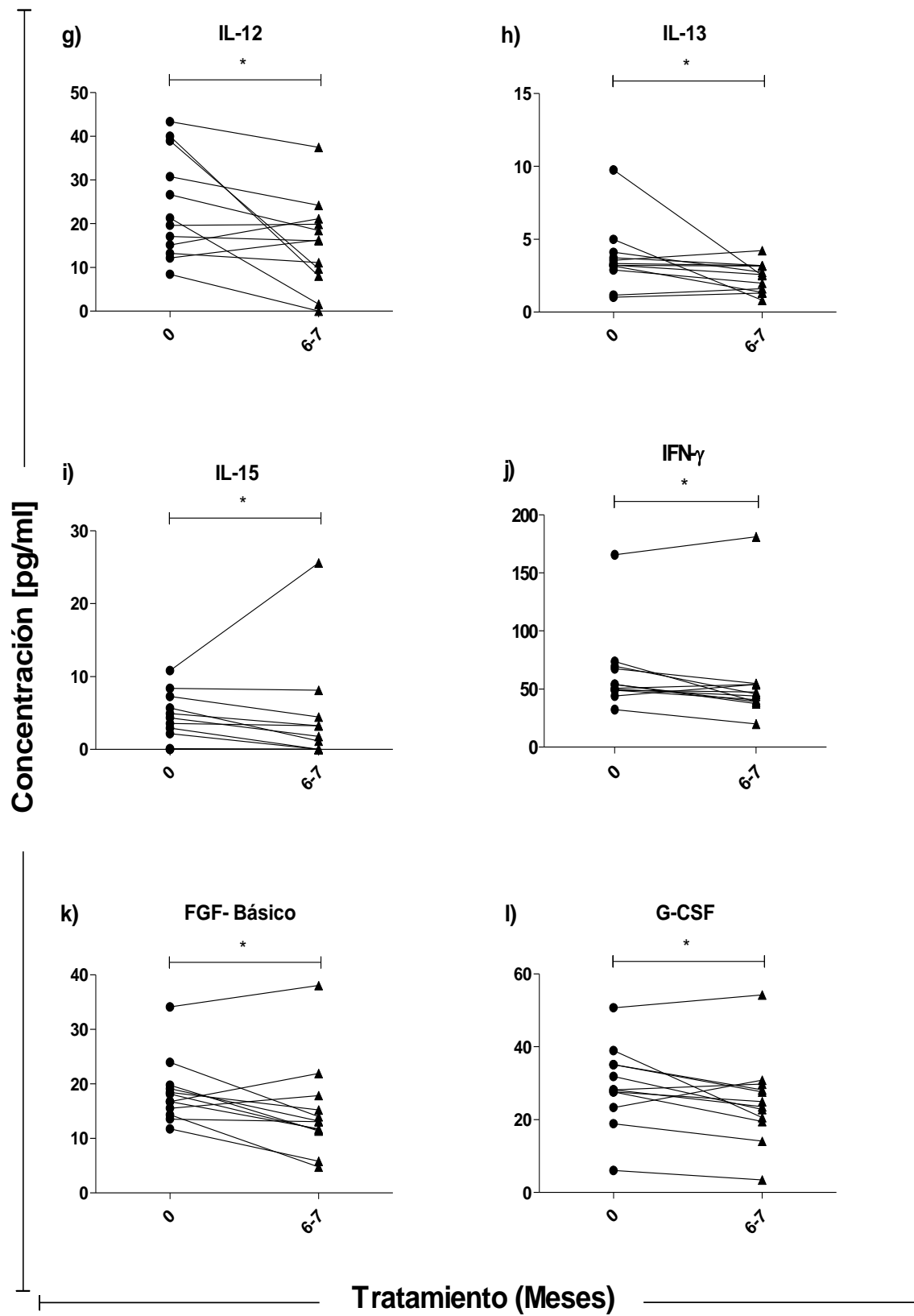


Figura 6. Continuación.

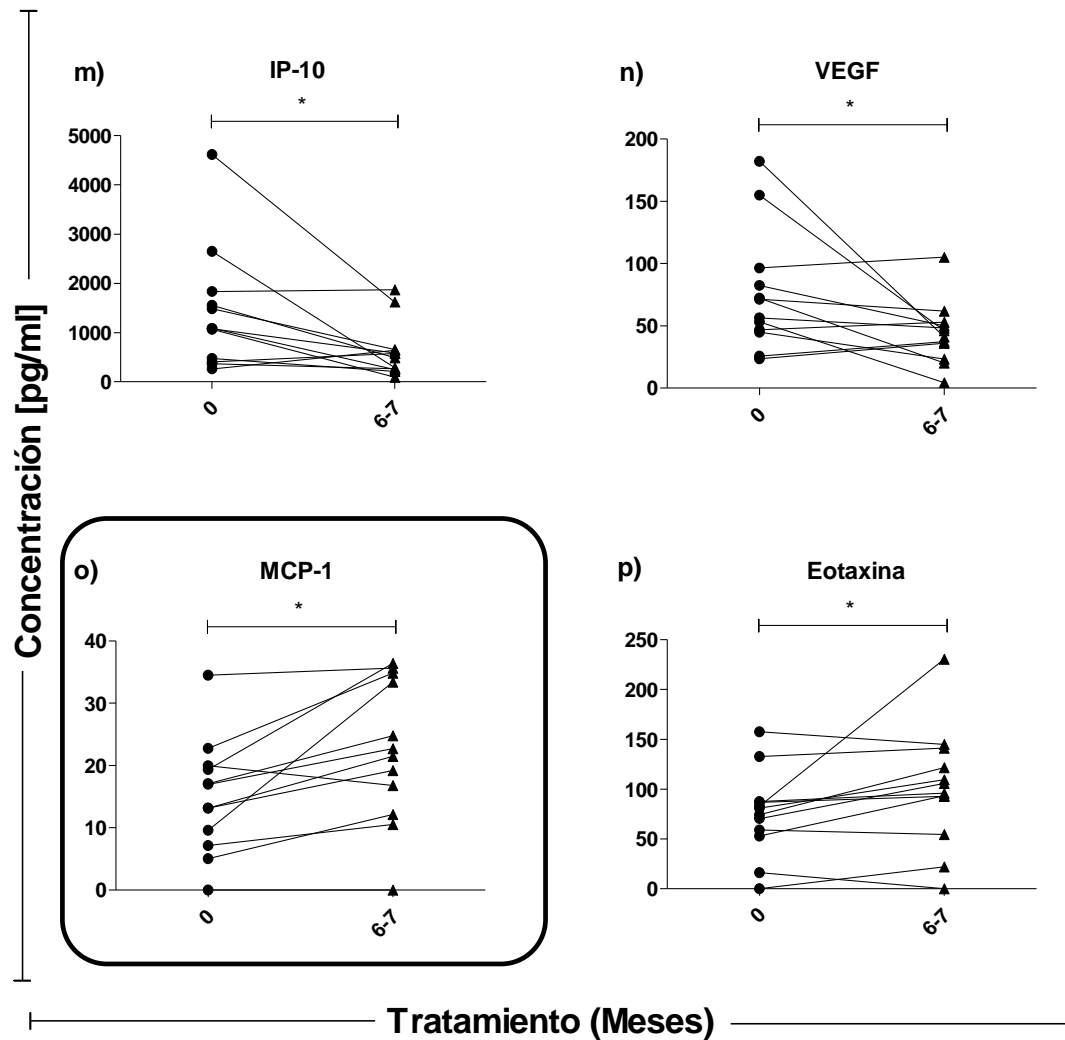


Figura 6. Continuación.

Biomoléculas de respuesta tardía al tratamiento en pacientes con TB-MFR.

Se evaluó la respuesta tardía de pacientes con TB-MFR analizando 27 moléculas a los 11-12 y 24-25 meses de tratamiento. A los 11-12 meses se observó una disminución en la concentración de IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, FGF-Básico, G-CSF, IP-10 y VEGF (Figura 7 a-h), y un incremento de la concentración de eotaxina (Figura 7 i); y al término del tratamiento (24-25 meses) se encontró una disminución significativa en las concentraciones de IL-4, IL-7, IL-8, IL-9, IL-13, IL-15, FGF-Básico, GM-CSF, G-CSF, IFN- γ , IP-10, MIP-1 α , TNF- α y VEGF, respecto al tiempo 0 (antes de iniciar tratamiento) (Figura 8).

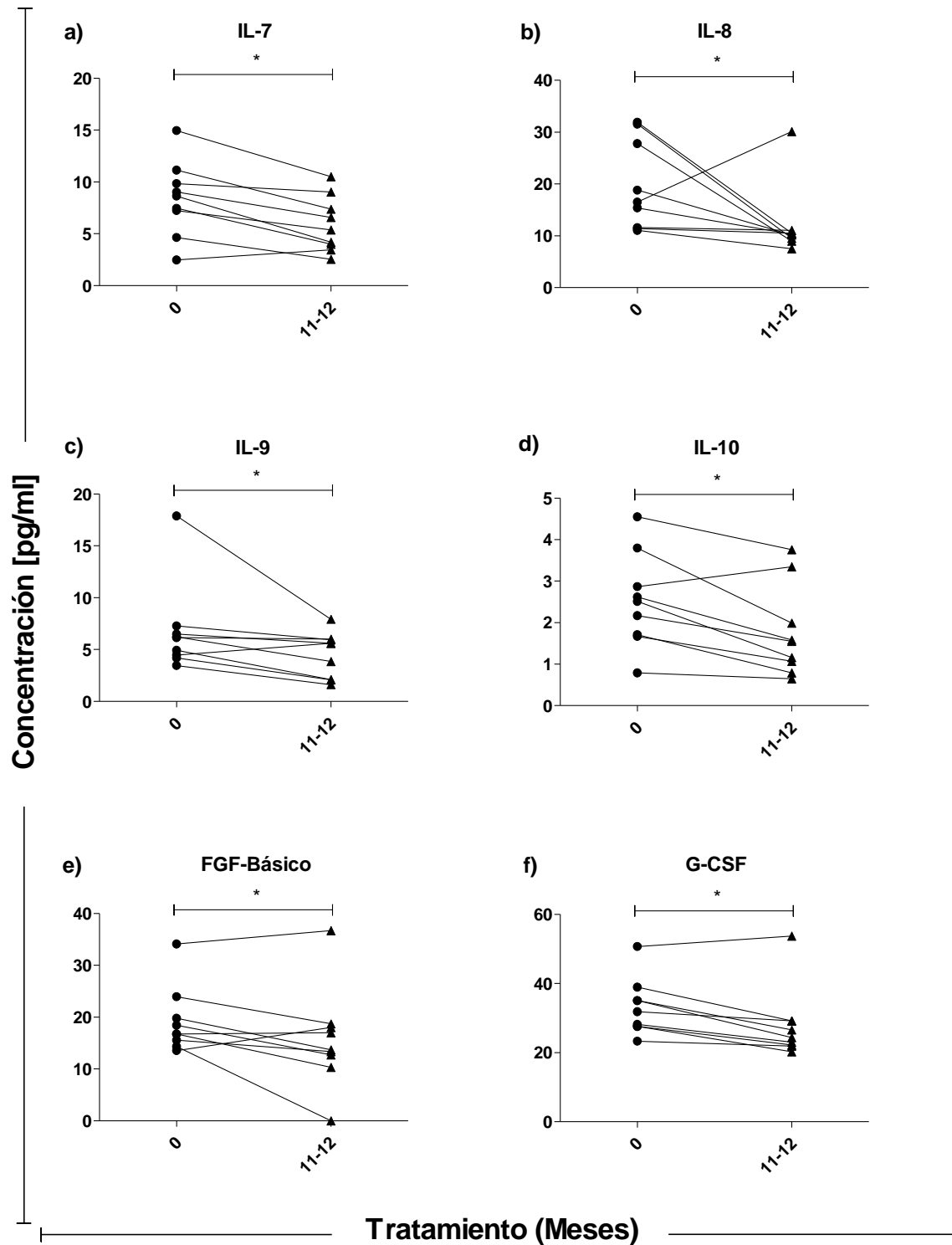


Figura 7. Perfil de citocinas a los 11-12 meses de tratamiento en suero de pacientes con tuberculosis multifármaco resistente (TB-MFR). Concentración [pg/ml] de a) IL-7, b) IL-8, c) IL-9, d) IL-10, e) FGF-Básico, f) G-CSF, g) IP-10, h) VEGF e i) Eotaxina de pacientes con TB-MFR (n=9), antes del tratamiento (0 meses) y a los 11-12 meses de tratamiento (11-12 meses). La diferencia entre tiempos se realizó con la prueba estadística Wilcoxon Signed Rank Test, considerando diferencia significativa una $P \leq 0.05$. * Diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento ($P \leq 0.05$).

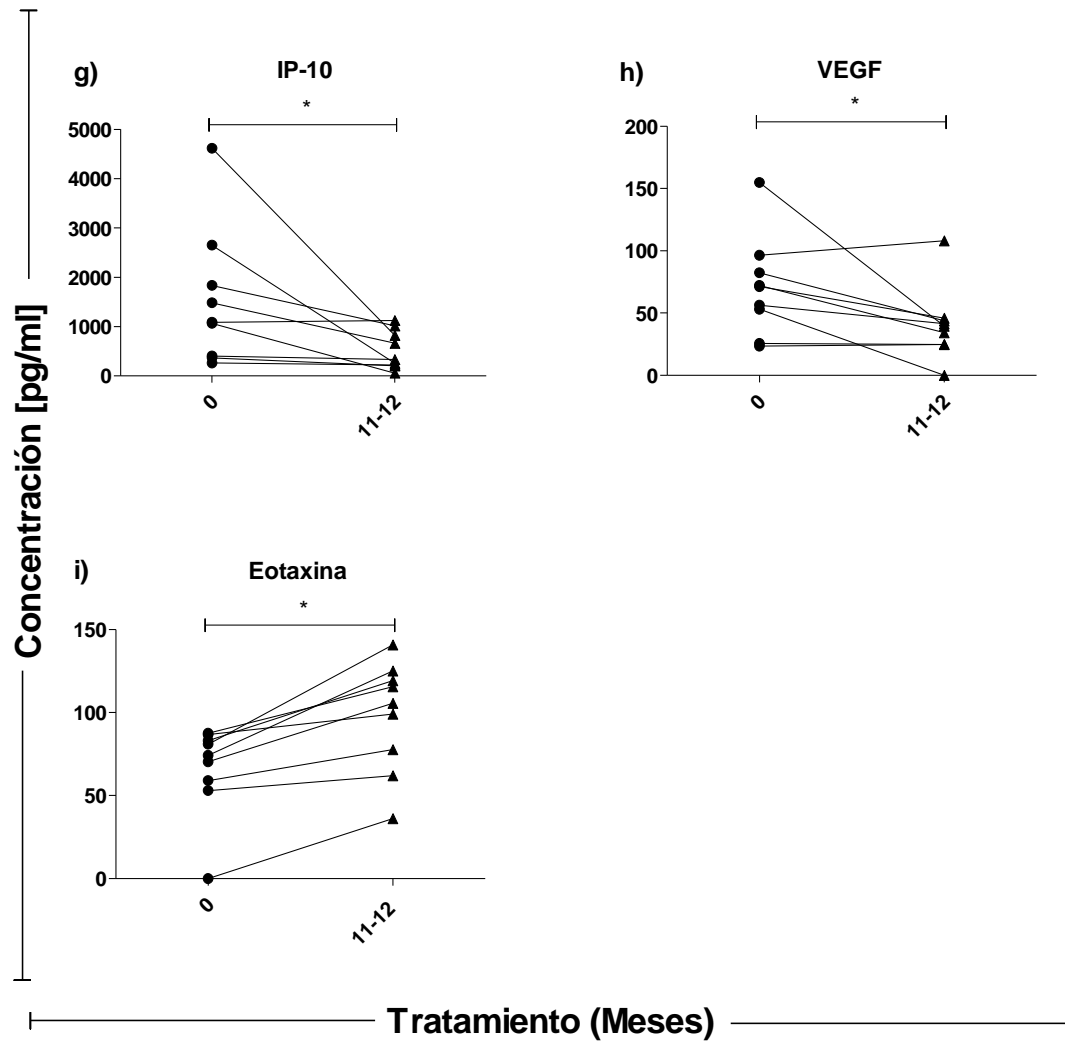


Figura 7. Continuación.

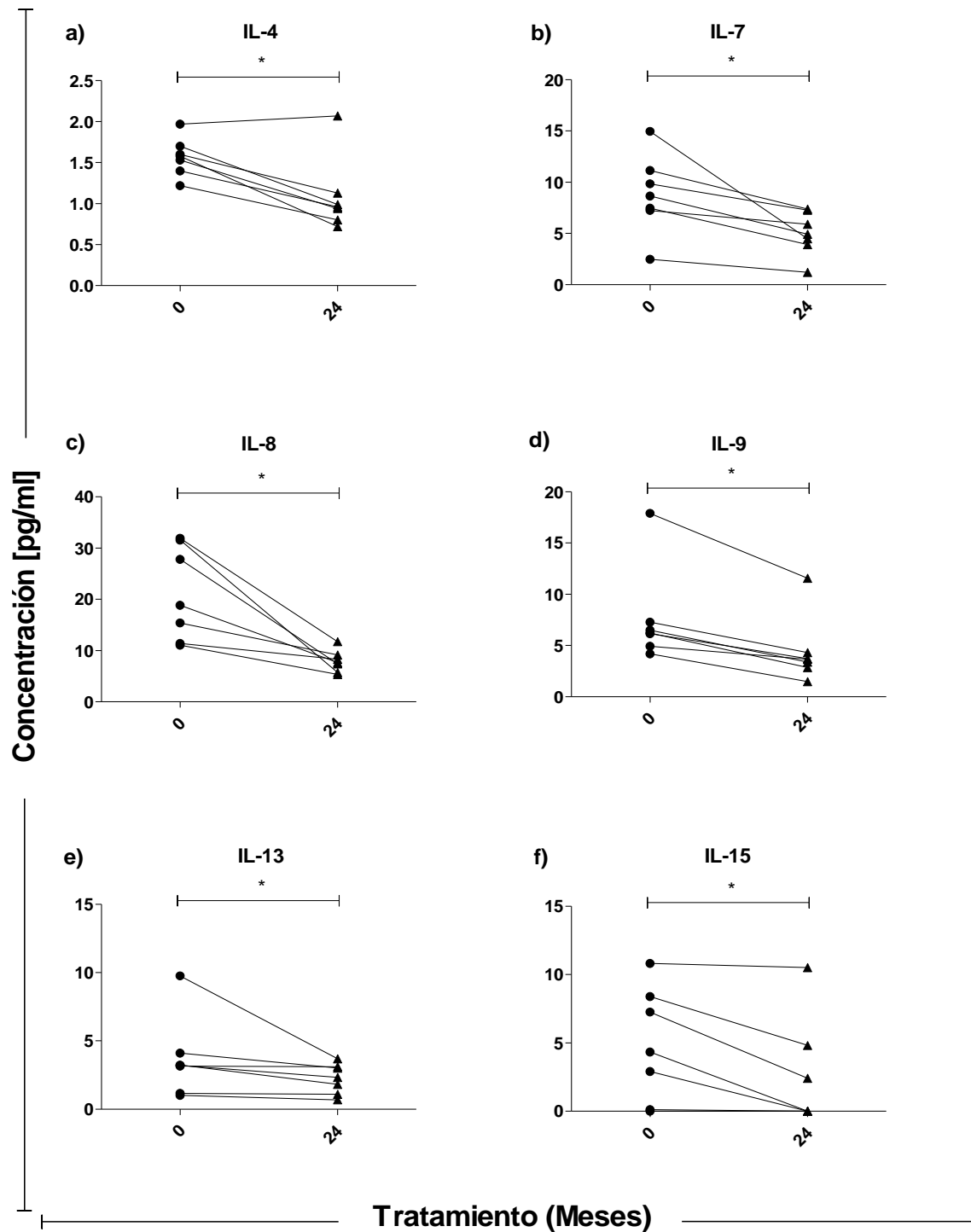


Figura 8. Perfil de citocinas al término de tratamiento (24-25 meses) en suero de pacientes con tuberculosis multifármaco resistente (TB-MFR). Concentración [pg/ml] de a) IL-4, b) IL-7, c) IL-8, d) IL-9, e) IL-13, f) IL-15, g) FGF-Básico, h) G-CSF, i) GM-CSF, j) IFN- γ , k) IP-10, l) MIP-1 α , m) TNF- α y n) VEGF de pacientes con TB-MFR (n=7), antes del tratamiento (0 meses) y a término de tratamiento (24-25 meses). La diferencia entre tiempos se realizó con la prueba estadística Wilcoxon Signed Rank Test, considerando diferencia significativa una $P \leq 0.05$. * Diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento ($P \leq 0.05$).

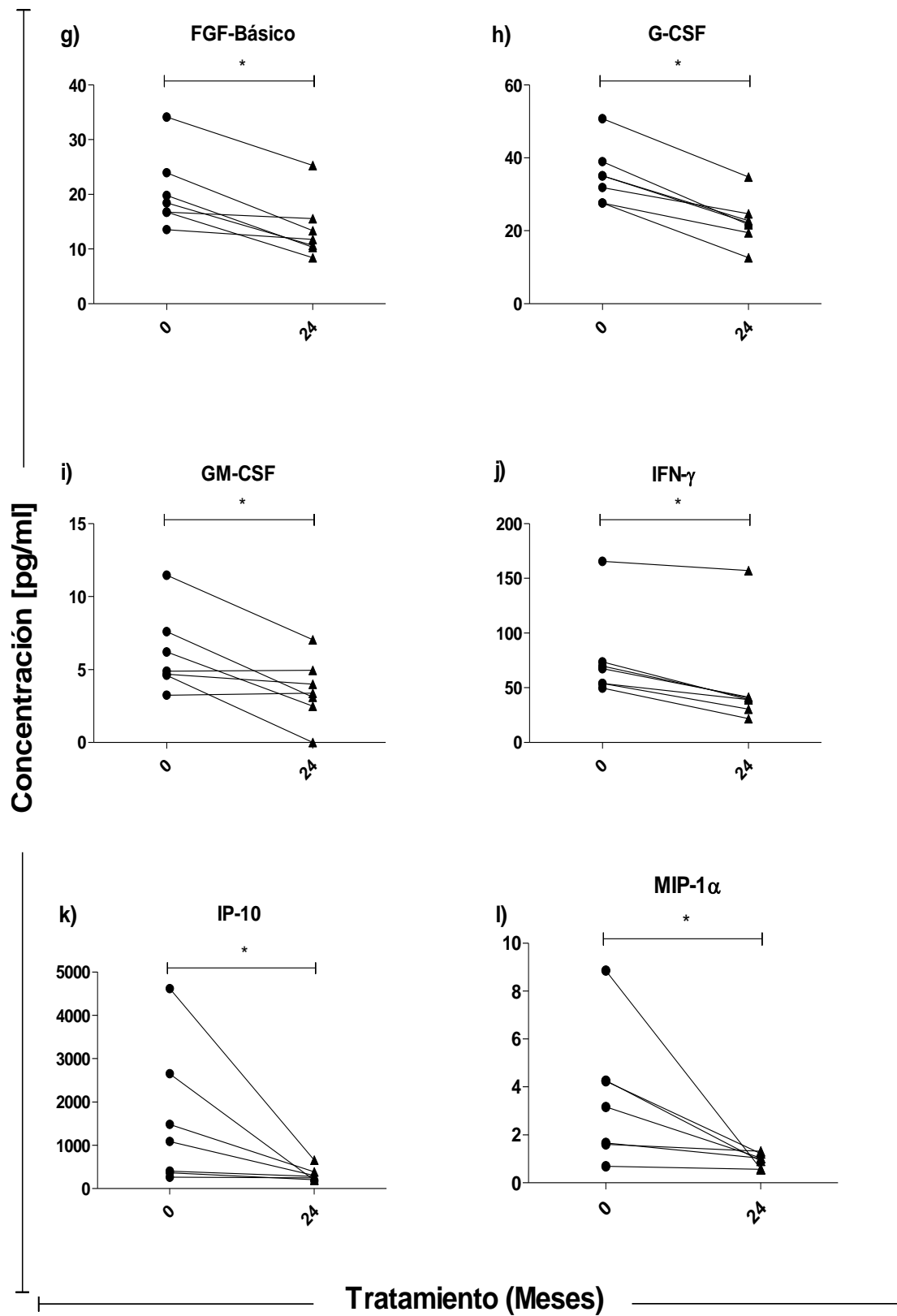


Figura 8. Continuación.

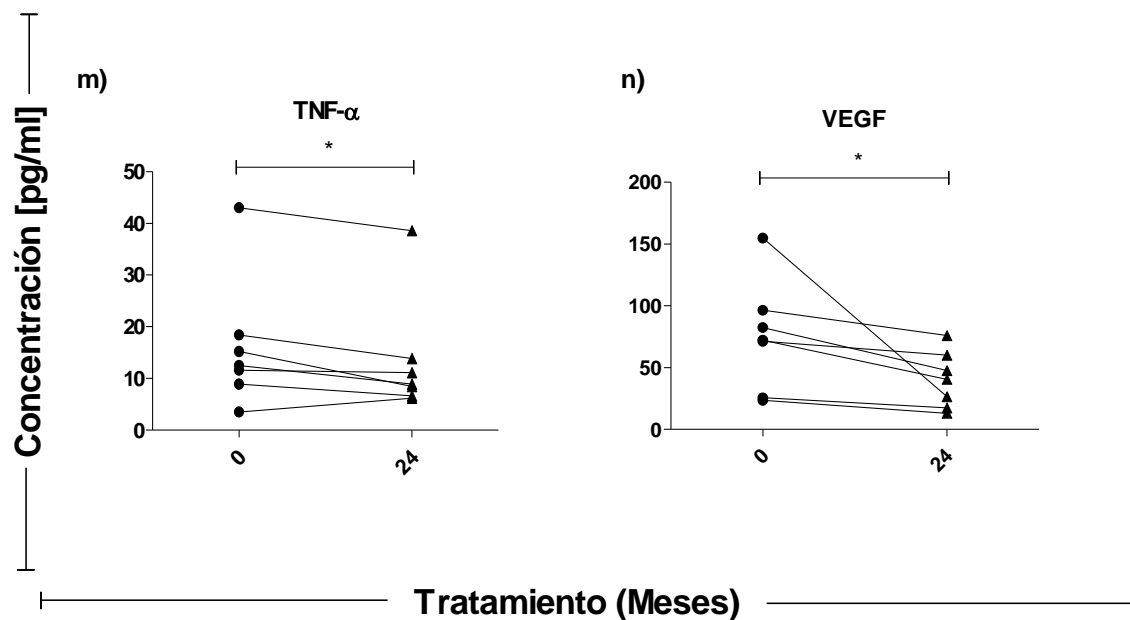


Figura 8. Continuación.

El análisis en los cambios en las concentraciones de las 27 moléculas se realizó primero con la prueba de Wilcoxon Signed Rank Test y con la prueba de Prueba de rangos de Wilcoxon, las diferencias se muestran en la tabla 4. Por otro lado, debido a que el 50% de los pacientes tiene como co-morbilidad a la DM2, se estableció una subdivisión de pacientes clasificándolos como pacientes con TB-MFR-DM2 (n=6) y pacientes con TB-MFR (n=6) para conocer si la diferencia significativa en las moléculas se debe a la DM2. A los 3 y 6-7 meses no se observó diferencia significativa en ninguna molécula. A los 6-7 meses de tratamiento la IL-7 y MCP-1 mostraron diferencia significativa.

Tabla 4. Moléculas con diferencia significativa durante y al finalizar el tratamiento utilizando las pruebas de Wilcoxon Signed Rank Test y la prueba de rangos de Wilcoxon

| Grupo de citocina. | Tiempo de tratamiento (Meses). | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|---|-----|-------|-------|
| | 1 | 3 | 6-7 | 11-12 | 24-25 |
| Pro-inflamatoria. | | | | | |
| IL-8 | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| IFN- γ | | ■ | ◆ | ● | ■ |
| IL-6 | | ■ | | ● | ● |
| IL-12 | | | ■ | ● | ● |
| IL-1 β | | | | | ● |
| IL-2 | | | | | ● |
| TNF- α | | | | | ■ |
| Anti-inflamatoria. | | | | | |
| IL-4 | | ■ | ■ | ● | ■ |
| IL-10 | | | ■ | ■ | ● |
| IL-13 | | | ◆ | | ■ |
| IL-1ra | | | ■ | ● | |
| IL-5 | | | | | ● |
| Homeostasis | | | | | |
| IL-7 | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| IL-9 | | ● | ■ | ■ | ■ |
| IL-15 | | | ◆ | | ■ |
| IL-17 | | | | | ● |
| Quimiocinas | | | | | |
| Eotaxina | ● | ◆ | ■ | ● | |
| IP-10 | | | ■ | ■ | ■ |
| RANTES | | | | ● | ● |
| MCP-1 | | | ■ | | ● |
| MIP-1 α | | ● | | | ■ |
| MIP-1 β | | | | | ● |
| Factor de crecimiento | | | | | |
| G-CSF | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| FGF-Básico | | | ■ | ■ | ■ |
| VEGF | | | ◆ | ■ | ■ |
| PDGF- $\beta\beta$ | | | | | ● |
| GM-CSF | | | | | ■ |

●: Diferencia con prueba de rangos de Wilcoxon, ◆: Diferencia con prueba de Wilcoxon Signed Rank Test, y
 ■: Diferencia con ambas pruebas.
 ■ : Aumentó Significativamente.

Biomoléculas en el tiempo de negativización del cultivo de M.tuberculosis en pacientes con TB-MFR.

Al comparar la concentración antes de iniciar tratamiento vs la negativización del cultivo, la concentración de biomoléculas mostró que la IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- γ y G-CSF disminuyeron significativamente (Figura 9 a-f) mientras la concentración de eotaxina se incrementó significativamente (Figura 9 g).

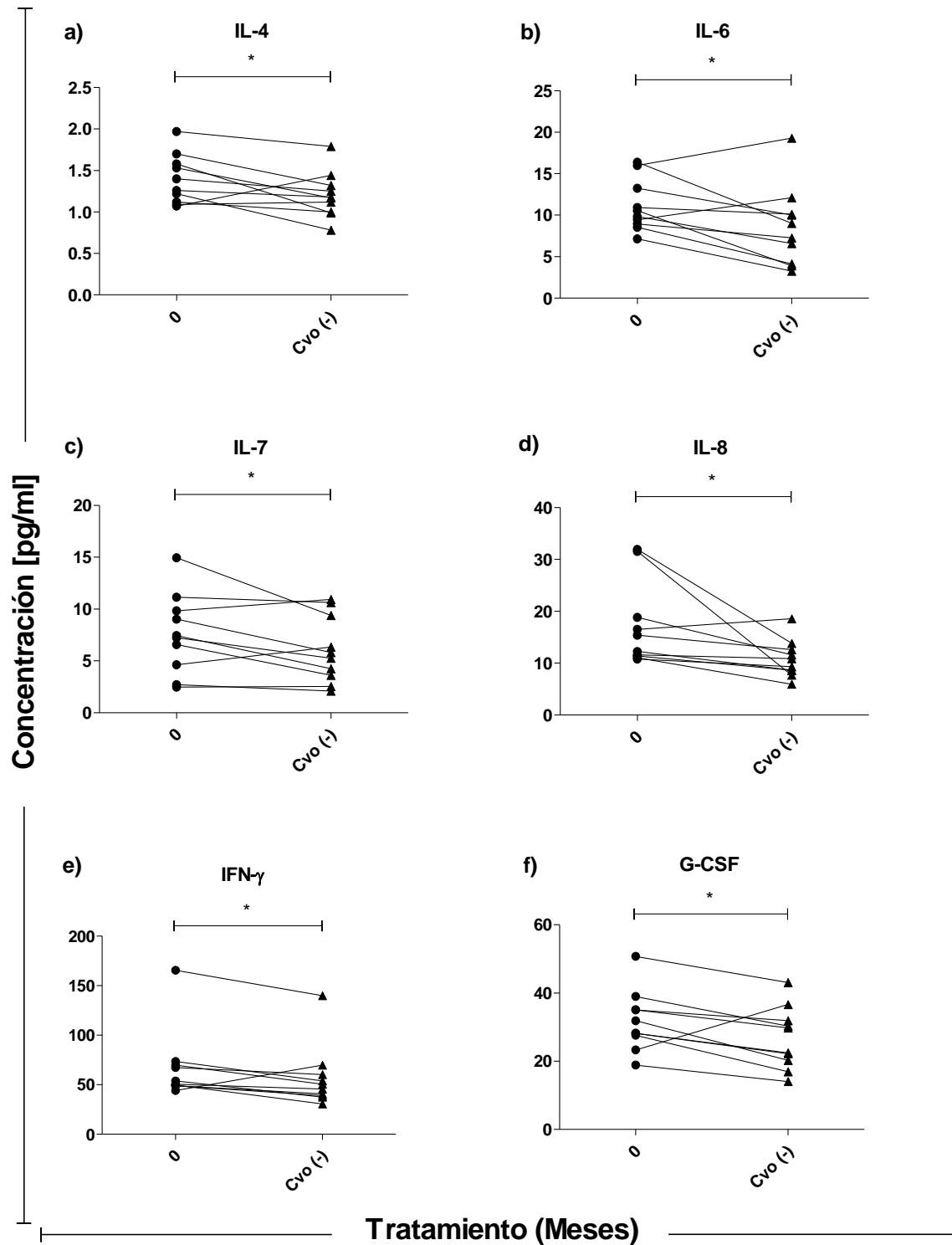


Figura 9. Perfil de citocinas al tiempo de negativización del cultivo de *M. tuberculosis* en suero de pacientes con tuberculosis multifármaco resistente (TB-MFR). Concentración [pg/ml] de a) IL-4, b) IL-6, c) IL-7, d) IL-8, e) IFN- γ , f) G-CSF y g) Eotaxina, de pacientes con TB-MFR (n=10), antes del tratamiento (0) y tiempo de negativización del cultivo de *M. tuberculosis* (Cvo (-)). La diferencia entre tiempos se realizó con la prueba estadística Wilcoxon Signed Rank Test, considerando diferencia significativa una $P \leq 0.05$. * Diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento ($P \leq 0.05$).

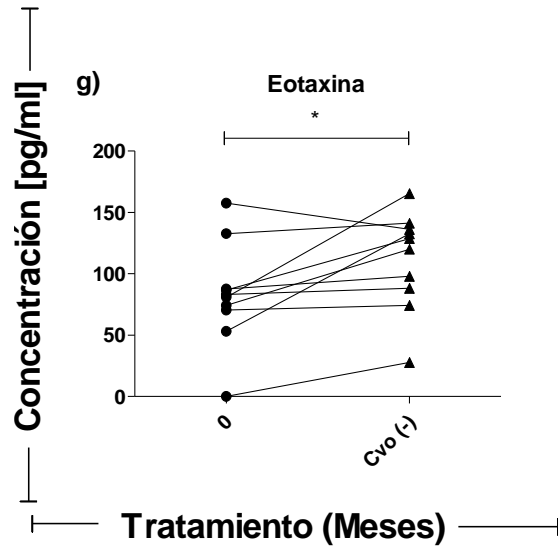


Figura 9. Continuación.

Biomoléculas de eficacia al tratamiento en pacientes con TB-MFR.

Para la identificación de biomarcadores de respuesta al tratamiento se comparó la concentración de cada molécula a los diferentes tiempos de tratamiento por medio de una prueba de comparación múltiple y se observó que la IL-4, IL8, IL-9, IFN- γ , G-CSF, IP-10 y eotaxina pueden ser candidatos como posibles biomarcadores de eficacia a la terapia (Tabla 5, Figura 10).

Tabla 5. Biomoléculas propuestas como biomarcadores para evaluar la eficacia al tratamiento en pacientes con TB-MFR.

| Grupo de citocina. | Tiempo de tratamiento (Meses). | Concentración a través del tratamiento |
|------------------------------|--------------------------------|--|
| | 24-25 | |
| Pro-inflamatoria. | | |
| IL-8 | * | Disminuye |
| IFN- γ | * | Disminuye |
| Anti-inflamatoria. | | |
| IL-4 | * | Disminuye |
| Homeostasis | | |
| IL-9 | * | Disminuye |
| Quimiocinas | | |
| Eotaxina | * | Aumenta |
| IP-10 | * | Disminuye |
| Factor de crecimiento | | |
| G-CSF | * | Disminuye |

* Moléculas con diferencia significativa.

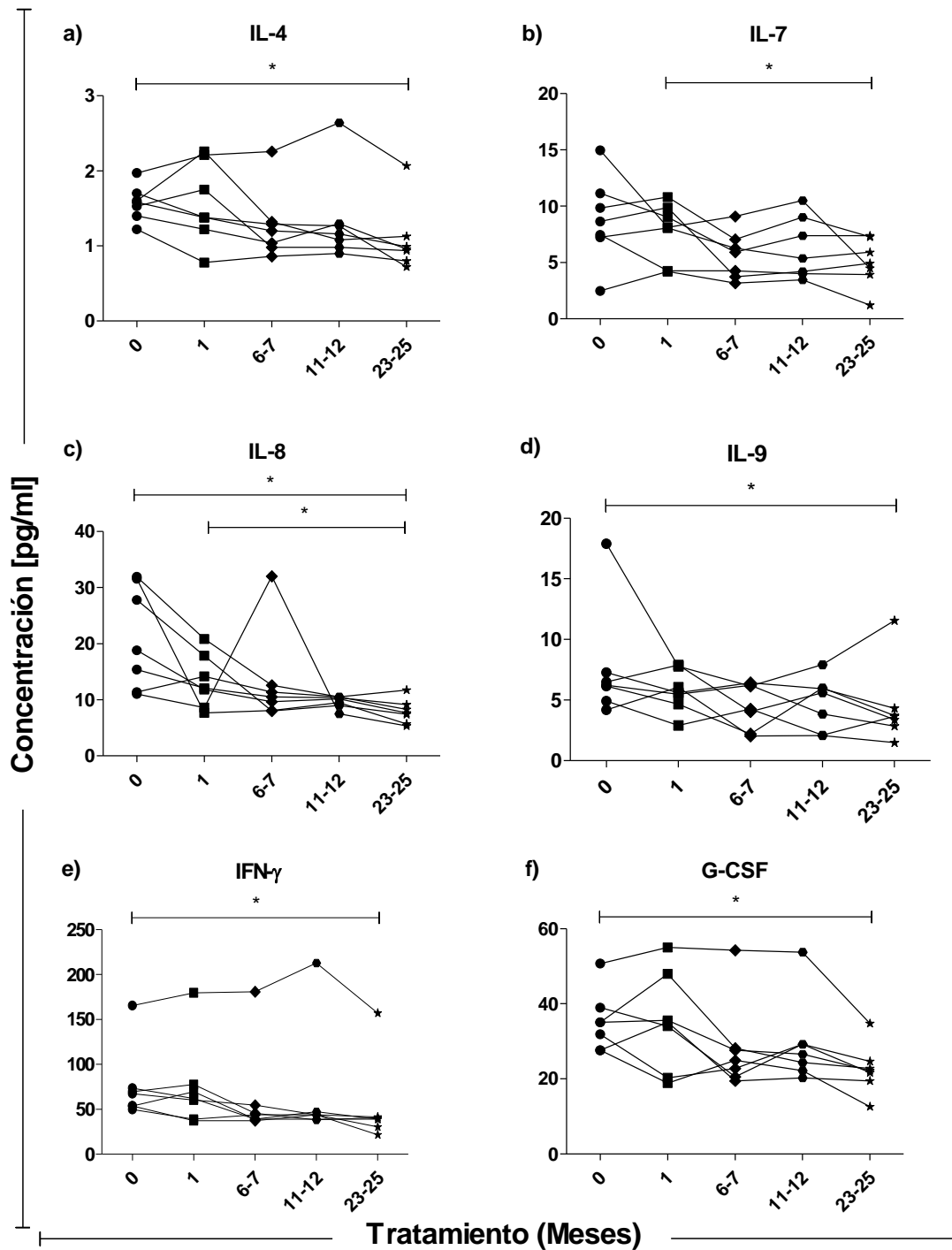


Fig. 10. Citocinas propuestas como biomarcadores para evaluar la eficacia al tratamiento en suero de pacientes con tuberculosis multifarmaco resistente (TB-MFR). Concentración [pg/ml] de a) IL-4, b) IL-7, c) IL-8, d) IL-9, e) IFN- γ , f) G-CSF, g) IP-10), h) VEGF e i) Eotaxina, de pacientes con TB-MFR (n=7), antes del tratamiento (0 meses), durante el tratamiento (1, 6-7, 11-12 meses) y al finalizar el tratamiento (23-25 meses). Las diferencias entre grupos se realizaron con la prueba estadística ANOVA de una vía y la comparación entre tiempos se realizó con la prueba de Dunn's Multiple Comparison Test, considerando diferencia significativa una $P \leq 0.05$. * Diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento ($P \leq 0.05$).

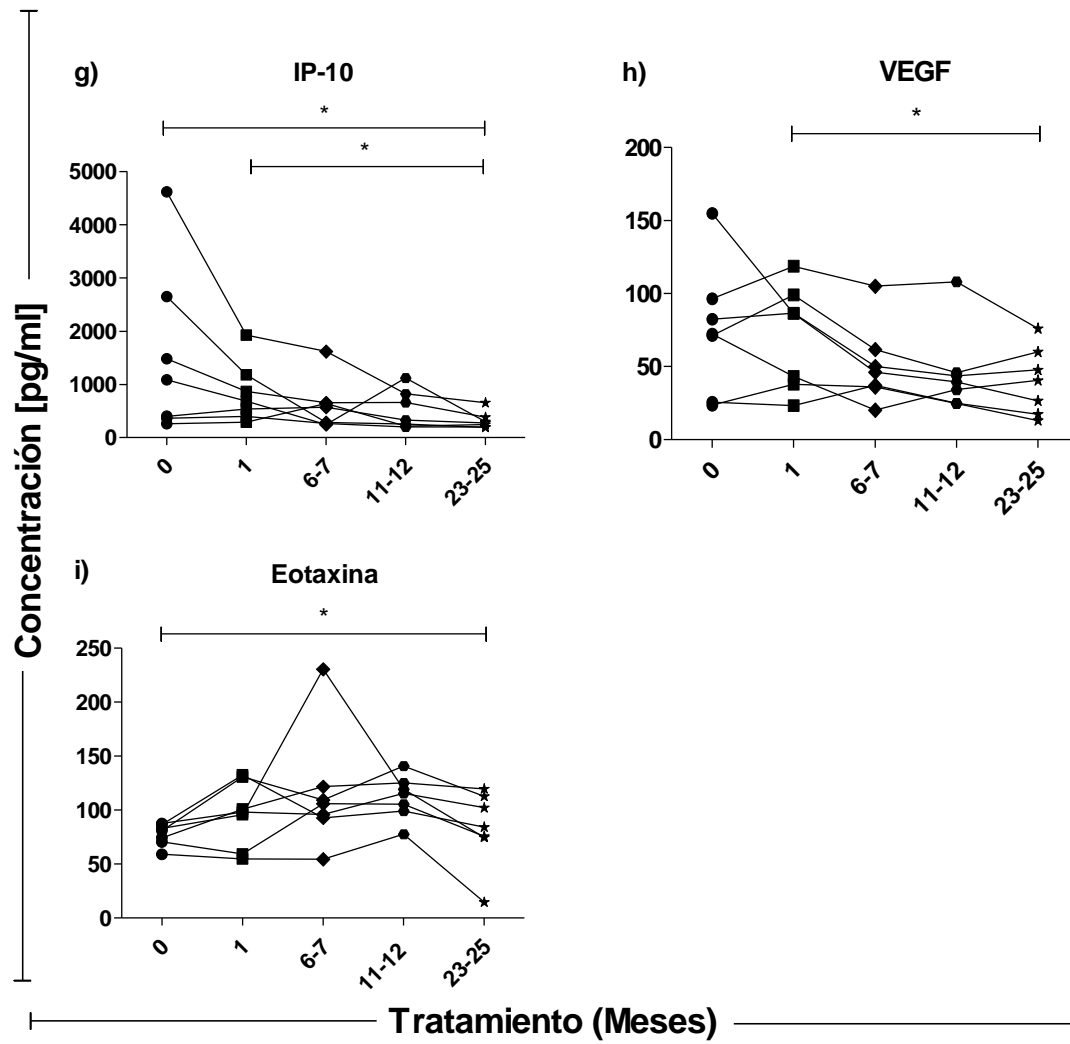


Fig. 10. Continuación.

Discusión.

Se ha reportado que la TB-MFR es más frecuente en el sexo masculino y en un rango de edad de 35 a 49 años.(4,65) Los pacientes con TB-MFR analizados en este estudio coinciden con estos datos, es más frecuente en hombres que en mujeres (5:1), la edad promedio es de 43 años, y el 50% de los pacientes tenían como comorbilidad DM2.

Las 27 biomoléculas analizadas son representativas de cinco grupos de acuerdo a su función principal: pro-inflamatorias, anti-inflamatorias, homeostasis, quimiotácticas y factores de crecimiento, estos grupos de moléculas no han sido estudiados previamente durante el tratamiento en pacientes con TB-MFR.

Observamos que el comportamiento general de estas moléculas durante los meses de tratamiento es el siguiente: a tiempos tempranos disminuyen las moléculas pro-inflamatorias (3 meses) posteriormente la anti-inflamatorias (6-7 meses), a tiempos tardíos disminuyen las moléculas pro-inflamatorias y factores de crecimiento (11-12 meses) y al termino de tratamiento todos los grupos de citocinas disminuyen (24-25 meses).

Datos previos en pacientes con TB fármaco-sensible reportan que IP-10 disminuye y MCP-1 y eotaxina se incrementa a la semana 1, al mes 1, 3 y 6 de tratamiento (66), estos hallazgos son similares a los nuestros donde observamos una disminución de IP-10 a los 3 meses de tratamiento (Figura 5b), un aumento MCP-1 al mes 6, y eotaxina a 1, 3 y 6 meses de tratamiento (Tabla 5). Esto sugiere que la respuesta de estas moléculas es similar para ambas cepas de *M.tuberculosis* (fármaco-sensibles y multi-fármaco resistentes), siendo independiente de la resistencia a fármacos.

Por otro lado, en el grupo de pacientes con TB-MFR que analizamos observamos que MIP-1 α y TNF- α disminuyen sin diferencia significativa al mes 1 de tratamiento (datos no mostrados). Contrario a nuestros resultados Siawaya y cols. encontraron un aumento de TNF- α y MIP-1 α al mes de tratamiento en pacientes con TB farmaco-sensibles, sin

embargo, este incremento solo lo observaron antes de la conversión de cultivo y después disminuye lo que indica que no es un cambio debido a la eliminación de *M.tuberculosis*.

Por otro lado, se observó que el 50% de los pacientes analizados presentaba como comorbilidad a la DM2, para saber cuáles citocinas pudieran estar asociadas al proceso inflamatorio que causa la diabetes. Recientemente, varios estudios epidemiológicos han demostrado que la DM2 se asocia positivamente con la TB, debido a que la DM2 incontrolada aumenta la posibilidad de desarrollar TB, lo que refleja un importante vínculo entre las enfermedades, sin embargo la direccionalidad de las enfermedades sigue siendo un tema de controversia.(67)

En los pacientes que tienen como comorbilidad DM2 (TB-MFR-DM2) encontramos una disminución significativa de IL-7 y un aumento significativo de MCP-1. Similar a nuestros resultados, datos previos en pacientes con DM2 reportan una disminución significativa de IL-7 respecto al grupo control. Contrario a nuestros resultados, Hui Hang y cols. observaron una disminución significativa de MCP-1 en pacientes con DM2 en comparación con el grupo control.(68) Debido a lo anterior, los resultados que observamos podría sugerir que la disminución en IL-7 podría atribuirse a la DM2 y no la TB-MFR mientras que el incremento que observamos en MCP-1 si se debe a la TB-MFR. Sin embargo, debido a que el número de pacientes en cada grupo es insuficiente (n=6) se requiere de un análisis con un mayor número de pacientes para corroborar si los datos están o no influenciados por la DM2.

Se ha reportado que la eliminación de *M.tuberculosis* está asociada con la negativización del cultivo, cuando analizamos el tiempo de negativización con respecto al valor de las moléculas antes del tratamiento observamos que IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- γ , eotaxina y G-CSF disminuyen significativamente, lo que indica un papel importante de estas moléculas en la TB-MFR.

Este es el primer estudio del comportamiento de moléculas de la respuesta inmune en suero una vez que *M.tuberculosis* es eliminada después del tratamiento anti-TB-MFR y observamos que antes del tratamiento existe un incremento de moléculas pro-inflamatorias y de quimiocinas pero también de las anti-inflamatorias, factores de crecimiento y de homeostasis lo que refleja una inflamación severa con daño al tejido, una vez que se inicia el tratamiento hay una disminución significativa de prácticamente todas las moléculas al final del tratamiento con respecto a la concentración que se encontraba antes del tratamiento lo que indica que una vez contenida la infección con *M.tuberculosis* disminuye la activación y producción de moléculas solubles a nivel sistémico.

Respecto a las moléculas que pueden ser potenciales biomarcadores de eficacia al tratamiento se encuentran la IL-8, IFN- γ , IL-4, IL-9, IP-10 y G-CSF las cuales disminuyen y la Eotaxina que se incrementa al final de la terapia exitosa anti-TB-MFR. Datos previos en pacientes con TB fármaco-sensible reportan que IP-10 y VEGF disminuyen significativamente a partir de la semana 26 después de iniciar la terapia anti-TB(52) y proponen que la disminución en las concentraciones de IP-10 y VEGF podría ser útil para monitorear el tratamiento de la TB y que una constante elevación de estas moléculas reflejaría una terapia ineficaz o incumplimiento de tratamiento.(52) Estos resultados son similares a nuestros resultados donde observamos una disminución de VEGF e IP-10 aunque la disminución solo es significativa en IP-10 al final del tratamiento, por lo cual nuestros datos apoyan el uso de IP-10 en el monitoreo del tratamiento en pacientes con TB-MFR.

Por último, para que estos biomarcadores sean útiles para el seguimiento de la terapia, se requiere que el seguimiento de las concentraciones de citocinas se realice por lo menos en cuatro tiempos antes o al inicio del tratamiento, a los 6 meses que es cuando termina la fase intensiva del tratamiento, a los 12 meses y al final del tratamiento; y que el valor obtenido de la molécula evaluada cambie respecto a su valor anterior de manera individual. Sin embargo, estos biomarcadores tienen limitaciones para su uso en pacientes con DM2.

Estos candidatos como posibles biomarcadores necesitan ser estudiados y validados en un futuro a gran escala. Sin embargo, los resultados son prometedores, ya que si son validados podrían conducir al desarrollo de intervenciones clínicas en los pacientes con TB-MFR.

Limitaciones del estudio.

El porcentaje de éxito de seguimiento de pacientes con TB-MFR a 24 meses fue menor al 50% y las muestras de sangre no se pudieron obtener en los mismos tiempos para el seguimiento microbiológico del tratamiento, por lo que el análisis se realizó únicamente antes de tratamiento, a los 3, 6, 12 meses y al final de tratamiento.

Las diferencias significativas entre cada tiempo y antes de iniciar tratamiento deben analizarse en un grupo mayor de pacientes que permita evaluar un grupo de TB-MFR con DM2 como co-morbilidad para corroborar que los cambios observados no estén influenciados por la DM2.

Conclusión.

Se propone la medición simultánea de IP-10, IL-8, IFN- γ , IL-4, IL-9, G-CSF y la Eotaxina antes y al final de la terapia anti-TB-MFR para evaluar la eficacia al tratamiento, una disminución con respecto al valor inicial de IP-10, IL-8, IFN- γ , IL-4, IL-9, G-CSF y un incremento de eotaxina se asociaría con la eficacia al tratamiento mientras un comportamiento diferente indicaría una falla.

Bibliografía.

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2013
2. WHO. México Perfil de tuberculosis. 2014;
3. Bermejo MC, Clavera I, Rosa FJM De, Marín B. Epidemiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar.* 2007;30(2):7–20.
4. Secretaría de Salud. Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. 2012.
5. Secretaría de Salud. Guía para la Atención de Personas con Tuberculosis Resistente a Fármacos. 2010.
6. Murray, PR, Ken S. Rosenthal MP. Microbiología médica. 5ta ed. España: ELSEVIER; 2006
7. Michael T.Madigan, John M.Martinko, David A. DPC. Brock Biology of Microorganisms. 13th ed. Benjamin Cummings, San Francisco, CA: Pearson Education; 2009.
8. OMS. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud.; 2008.
9. Gorocica P. , Maria del Carmen Jimenez-Martinez, Yonathan Garfias, Isabel Sada RL. Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2005;18(2):142–53.
10. WHO | Tuberculosis. World Health Organization; 2015.
11. Aidar O, Ambroggi M. Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Hospital Muñiz. Argentina; 2010
12. Bonachera JC, Rosique MSB. Tuberculosis. Diagnóstico y tratamiento. In: José Gregorio Soto Campos, editor. Manual de diagnóstico y terapéutica en neumología. 1a Edición. Madrid.: ERGON.; 2005.
13. Secretaria de Salud. Manual para la aplicacion y lectura de la prueba de la tuberculina (PPD). 2013;
14. Wlodarczyk M, Rudnicka W, Janiszewska-Drobinska B, Kielnierowski G, Kowalewicz-Kulbat M, Fol M, et al. Interferon-gamma assay in combination with tuberculin skin test are insufficient for the diagnosis of culture-negative pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2014 Jan;9(9):e107208.

15. Laniado Laborín RCV. No siempre una baciloscopía positiva indica tuberculosis. Otra razón para solicitar cultivos rutinariamente. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2005;18(4):286–9.
16. Gholoobi A, Masoudi-Kazemabad A, Meshkat M, Meshkat Z. Comparison of Culture and PCR Methods for Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Different Clinical Specimens. *Jundishapur J Microbiol.* 2014 Feb;7(2):e8939.
17. Latorre P. Guía de atención de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. Colombia: Programa de Apoyo a la Reforma de Salud; 2012.
18. Silva C, Bermúdez V, Arraiz N, Bermúdez F, Rodríguez M, Valdelamar L. Fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. *Arch Venez Farmacol y Ter.* 2007;26(1):21–6.
19. WHO. Treatment of tuberculosis guidelines [Internet]. 4ta Edició. Bmj. World Health Organization; 2010.
20. Lado FLL, Ramos RG, Molino MLPDEL. Tuberculosis resistente a fármacos. *AN MED INTERNA.* 2004;21(4):190–6.
21. Quirós-Roldán E, Airoidi M, Moretti F, Carosi G. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Diagnóstico Biológico.* Editorial Siglo; 2001;50(4):200–3.
22. Ugarte-Gil. C. Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Medica Peru.* 2008;25(3):171–5.
23. Günther G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges. *Clin Med (Northfield Il).* 2014;14(3):279–85.
24. Cecilia M, Figueroa EG. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* . Una revisión. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2001;14(2):114–28.
25. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:93–129.
26. Herrera Barrios MT y C. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2005;18(4):327–36.
27. Van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr 1;15(2):294–309.

28. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004 Jan;120:213–32.
29. Boom W., Canaday DH, Fulton S a, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis.* 2003 Feb;83(1-3):98–106.
30. Eruslanov EB, Lyadova I V, Tatiana K, Majorov KB, Scheglov I V, Orlova MO, et al. Neutrophil Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice Neutrophil Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. *Infect Immun.* 2005;73(3):1744–53.
31. BIO-RAD. Bio-Plex Pro Assays. Cytokine, Chemokine, and Growth Factors. Instruction Manual.
32. Sodhi A, Gong J, Silva C, Qian D, Barnes PF. Clinical Correlates of Interferon Production in Patients with Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 1997 Sep;25(3):617–20.
33. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN BM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med.* 2001;345(15):1098–104.
34. Pedraza Sigifredo. Aldana Ruth. Herrera Maria Teresa. Torres Martha. Bustamante, Jacinta. Infecciones por *Mycobacterium* y *Salmonella* en pacientes con inmunodeficiencias asociadas al circuito IL-12/IL-23-IFN- γ (IL12B: aspectos biológicos y clínicos. *ENF INF MICROBIOL.* 2007;27(3):88–99.
35. Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Nishimura T, Anderson AC, Kuchroo VK, Remold HG, et al. IL-1 β promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. *J Immunol.* 2013 Apr 15;190(8):4196–204.
36. Hwa Lee, J. Hyun Chang J. Changes of plasma interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-8 and other serologic markers during chemotherapy in patients with active pulmonary tuberculosis. *Korean J Intern Med.* 2003;18:138–45.
37. Tsao TC y., Li L, Hsieh M, Liao S, Chang KS s. Soluble TNF- α receptor and IL-1 receptor antagonist elevation in BAL in active pulmonary TB. *Eur Respir J.* 1999 Sep;14(3):490.
38. Wang S, Diao N, Lu C, Wu J, Gao Y, Chen J, et al. Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population. *PLoS One.* 2012 Jan;7(12):e51338.
39. Boggaram V, Gottipati KR, Wang X, Samten B. Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-8 (IL-8)

expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2013 Aug 30;288(35):25500–11.

40. Ivana Alvarez, Ana Rovetta, Rodrigo Hernández Del Pino, Virginia Pasquinelli, Delfina Peña, Rosa Musella, Domingo Palmero, Héctor Chuluyán, Buka Samten PB. IL-9-producing cells promote Th1 responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2013;190(55.8):3015–23.
41. Gopal R, Monin L, Slight S, Uche U, Blanchard E, A. Fallert Junecko B, et al. Unexpected Role for IL-17 in Protective Immunity against Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 Infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004099.
42. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Natl Institutes Heal*. 2010;21(6):455–62.
43. Normanton M, Alvarenga H, Hamerschlak N, Ribeiro A, Kondo A, Rizzo LV, et al. Interleukin 7 Plays a Role in T Lymphocyte Apoptosis Inhibition Driven by Mesenchymal Stem Cell without Favoring Proliferation and Cytokines Secretion. *PLoS One*. 2014;9(9):e106673.
44. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer a, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, et al. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(January):302–6.
45. Malamut G, Machhour R El, Montcuquet N, Martin-lannerée S, Dusanter-fourth I, Verkarre V, et al. IL-15 trigger an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2131–43.
46. Maeurer MJ, Trinder P, Hommel G, Walter W, Freitag K, Atkins D, et al. Interleukin-7 or Interleukin-15 Enhances Survival of *Mycobacterium tuberculosis* - Infected Mice. *Infect Immun*. 2000;68(5):2962–70.
47. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha V V, Jawahar MS, Fay MP, Nutman TB, et al. Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary tuberculosis is associated with heightened systemic type 1, type 17, and other proinflammatory cytokines. *Ann Am Thorac Soc*. 2013 Oct [cited 2014 Dec 16];10(5):441–9.
48. Vargas L. Interleucina 13: una citocina con propiedades similares a IL-4. *IATREIA*. 1995;8(4):160–5.
49. Hur Y-G, Kang YA, Jang S-H, Hong JY, Kim A, Lee S a, et al. Adjunctive biomarkers for improving diagnosis of tuberculosis and monitoring therapeutic effects. *J Infect*. Elsevier Ltd; 2015;70(4):346–55.

50. Terán LM, Ledesma-soto Y, Krengel S, Lezcano-meza D. Eotaxinas en asma bronquial y poliposis nasal. *Gac Méd Méx.* 2006;142(2):139–44.
51. Djoba Siawaya JF, Beyers N, van Helden P, Walzl G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2009 Apr;156(1):69–77.
52. Riou C, Perez Peixoto B, Roberts L, Ronacher K, Walzl G, Manca C, et al. Effect of standard tuberculosis treatment on plasma cytokine levels in patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2012 Jan;7(5):e36886.
53. Xu S, Höglund M. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the production of cytokines in vivo. *Br J Haematol.* 2000;108:848–53.
54. Cho J, Park S, Lee H, Cho S, Kim YS. Mycobacterium tuberculosis -induced expression of granulocyte-macrophage colony stimulating factor is mediated by PI3-K / MEK1 / p38 MAPK signaling pathway. *BMB Rep.* 2013;213–8.
55. Lin Y, Gong J, Zhang M, Xue W. Production of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Tuberculosis Patients. *Infect Immun.* 1998;66(5):2319–22.
56. Saukkonen J, Bazydlo B. β -chemokines are induced by Mycobacterium tuberculosis and inhibit its growth. *Infect Immun.* 2002;70(4):1684–93.
57. Chensue S. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *Am Assoc Immunol.* 1999;3:165–73.
58. Marshall BG, Wangoo a., Cook HT, Shaw RJ. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *Thorax.* 1996 Dec 1;51(12):1253–61.
59. Román, JS. Palma, MJ. Hernández, FJ. León R. Marcadores biológicos. Utilidad para el control del paciente con hipertensión pulmonar. *Arch Bronconeumol.* 2011;47(Supl 7):21–5.
60. Markos Abebe AM. Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Tuberculosis. *Mycobact Dis.* 2013;03(02):2–5.
61. Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, Eugen-Olsen J, Ravn P. IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, and IL-1RA hold promise as biomarkers for infection with *M. tuberculosis* in a whole blood based T-cell assay. *BMC Res Notes.* 2009 Jan;2:19-27.

62. Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, Amicosante M, Girardi E, Goletti D. Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;38:754–6.
63. Geffner L, Yokobori N, Basile J, Schierloh P, Balboa L, Romero MM, et al. Patients with multidrug-resistant tuberculosis display impaired Th1 responses and enhanced regulatory T-cell levels in response to an outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* M and Ra strains. *Infect Immun.* 2009 Dec;77(11):5025–34.
64. De Araújo-Filho JA, Vasconcelos AC, Martins de Sousa E, Kipnis A, Ribeiro E, Junqueira-Kipnis AP. Cellular responses to MPT-51, GlcB and ESAT-6 among MDR-TB and active tuberculosis patients in Brazil. *Tuberculosis (Edinb).* 2008 Sep;88(5):474–81.
65. Moctezuma M. La tuberculosis y sus determinantes sociales en las Américas ... El caso de México. *Secretaria Salud Cent Nac Programas Prev y Control Enfermedades.* 2014.
66. Siawaya JD. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(1):69–77.
67. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med.* 2008;5(7):1091–101.
68. Hang H, Yuan S, Yang Q, Yuan D, Liu Q. Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2014;20(August):1137–45.