



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLOÓGICAS Y DE LA SALUD.  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.  
ISMAEL COSIO VILLEGAS

“Frecuencia de monocitos CD3+ TCR $\alpha\beta$ + /TCR $\alpha\beta$ - asociado con el estatus clínico y respuesta a tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar”

TESIS  
PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
NORMA ANGÉLICA TÉLLEZ NAVARRETE

Tutor.  
Dra. Leslie Chávez Galán  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Miembros del Comité Tutor.  
Dr. Rogelio Hernández Pando.  
Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas.  
Dra. Alejandra Renata Báez Saldaña.  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Febrero 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# ÍNDICE

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| I.RESUMEN .....                     | 3  |
| II.INTRODUCCIÓN.....                | 4  |
| III.ANTECEDENTES .....              | 10 |
| IV.DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....    | 11 |
| V.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....    | 11 |
| VI.JUSTIFICACIÓN.....               | 12 |
| VII.HIPÓTESIS.....                  | 12 |
| VIII.OBJETIVOS.....                 | 12 |
| IX.MATERIAL Y MÉTODOS.....          | 13 |
| X.ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....        | 16 |
| XI.CONSIDERACIONES ÉTICAS.....      | 16 |
| XII.RESULTADOS.....                 | 17 |
| XIII.DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES ..... | 30 |
| XIV.ANEXOS .....                    | 35 |
| XV. BIBLIOGRAFÍA .....              | 38 |

## I. RESUMEN

A pesar de los avances en los últimos años para el control de la tuberculosis (TB), esta enfermedad sigue siendo la primera causa de muerte por un agente infeccioso a nivel global. La inmunopatogénesis de la TB es muy compleja, para el control de la infección los monocitos y macrófagos tienen un rol esencial. Hace menos de una década Beham y cols., describieron una nueva subpoblación de monocitos CD3+TCR+, y en el granuloma de pacientes con TB la presencia de macrófagos TCR+, aparentemente su presencia depende del TNF. Recientemente se reportó, en un modelo de infección sistémica con BCG, que existen células mieloides CD3+ que pueden ser TCRαβ+ o TCRαβ- y la presencia de ambas poblaciones celulares dependen del receptor 1 del TNF (TNFR1). Al momento, no se han descrito la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos CD3+ en pacientes con TB pulmonar, en este trabajo el objetivo principal fue conocer la frecuencia de monocitos CD3+TCRαβ+ y TCRαβ-, así como la presencia de las moléculas de la vía de TNF durante el tratamiento anti-TB. A partir de células mononucleadas (CMN) de sangre periférica de 29 sujetos con TB pulmonar se realizó inmunotipificación por citometría de flujo (anticuerpos anti-CD3, CD14, TCRαβ, TNF, TNFR1 y TNFR2), mediante ELISA se midieron los niveles plasmáticos de las formas solubles de los receptores del TNF, citocinas proinflamatorias y quimioquinas. A todos los pacientes se les realizó una valoración clínica, radiológica y microbiológica al momento del diagnóstico (basal), a los 2 meses y a los 6 meses posterior al inicio de tratamiento anti-TB. Los resultados revelaron que la frecuencia de monocitos CD3+ se encuentra incrementada basalmente y disminuye a los 6 meses de tratamiento anti-TB y predomina la subpoblación de monocitos CD3+TCRαβ-. Se observó también, que la expresión del tmTNFR2+ en los monocitos se encuentra disminuida al inicio y durante el tratamiento. En plasma destacamos que los niveles de sTNFR1 y sTNFR2 estuvieron incrementados al momento del diagnóstico y disminuyeron a los 2 y 6 meses de tratamiento anti-TB. En conclusión, la frecuencia de monocitos CD3+TCR+/TCR- está incrementada en pacientes con TB pulmonar y disminuye posteriormente al inicio del tratamiento anti-TB, sugiriendo que estas subpoblaciones tienen un papel en la infección aguda por *Mycobacterium tuberculosis*.

## II. INTRODUCCIÓN

### **Definición.**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb). M.tb pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M.bovis*, *M. caprae*, *M.canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* y *M. mungi*). La TB es una enfermedad transmitida vía aérea, en el 85% de los casos causa daño en el pulmón y en un porcentaje menor por afección extrapulmonar. Del 90 a 95% de los sujetos que cursan con infección primaria por M.tb eliminan al bacilo o controlan la infección permaneciendo en un estado latente, solo del 5 al 10% desarrollarán TB activa, los principales factores de riesgo asociados a la reactivación son la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), desnutrición y el tratamiento para neutralizar el factor de necrosis tumoral (TNF), otros factores de riesgo para TB son diabetes, tabaquismo y alcoholismo (1).

### **Epidemiología.**

La TB se encuentra entre las 10 primeras causas de muerte a nivel global, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018 se estimaron 10 millones (9.0 a 11.11 millones) de casos nuevos de TB y 1.2 millones de muertes por TB en personas negativas a VIH, se reportó una incidencia global de 130 casos /100,000 habitantes, dos tercios de todos los casos de TB predominan en 8 países: India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (6%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%). Se estima que el 3.4% de los casos nuevos de TB y 18% de los casos previamente tratados son resistentes a rifampicina (RR-TB) o multifarmacorresistente (MDR-TB por sus siglas en inglés) que son simultáneamente resistentes a rifampicina e isoniacida, el porcentaje mayor de estos casos predomina en India, China y la Unión Soviética (2).

La región de las Américas contribuye con el 3% del total de los casos de TB a nivel global. México ocupa el tercer lugar en América Latina en el número de casos estimados de TB (28,000 casos), sólo por debajo de Brasil y Perú (3). La tasa de incidencia global de TB en México reportada por la OMS en 2018 es de 23 casos (rango 18-29) por 100,000 habitantes (2), sin embargo, en algunos estados la incidencia es mayor; para la semana 52 del 2018 en Baja California se reportó una tasa de incidencia de 45.7/100,000, Sonora 33.1/100,000, Tamaulipas

30.7/100,000, Guerrero 29.1/100,000 y Sinaloa 27.6/100,000 habitantes. El número de casos de TB predomina en hombres y un rango de edad productiva (25 a 44 años) (4). El número de casos de TB reportados por Secretaria de Salud muestra la persistencia de la enfermedad, sin alcanzar al momento la disminución de la incidencencia propuestas por la OMS para el 2025 dentro de la estrategia para el fin de la TB .

### **Respuesta inmune innata y adaptativa en tuberculosis.**

Los bacilos de M.tb son inhalados en el tracto respiratorio donde infectan a macrófagos alveolares y células epiteliales. La micobacteria ingresa al macrófago por fagocitosis, este proceso puede ser mediado por diversos receptores de membrana como los receptores Fc $\gamma$ , receptor tipo 3 del complemento (CR3), receptor de manosa (RM), receptores scavenger entre otros, y tiene como finalidad degradar al patógeno (5). Sin embargo, la micobacteria utiliza diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune, por ejemplo; inhibe la fusión del fagosoma-lisosoma permitiendo su sobrevivencia dentro del macrófago de manera indefinida, se ha propuesto que la fagocitosis mediada por RM favorece este mecanismo de evasión de la respuesta inmune (6,7).

En el parénquima pulmonar, las células reclutadas en el sitio de infección por M.tb inician la formación de una estructura celular llamada granuloma, que tiene por objetivo contener y/o eliminar al bacilo (8). El granuloma esta conformado por diversas poblaciones celulares, en su centro predominan macrófagos espumosos, células gigantes multinucleadas y macrófagos epiteliales o epiteloides (9). Los macrófagos son células diferenciadas de monocitos que migran de la circulación sanguínea al parénquima pulmonar expresando el receptor de quimiocina CCR2 (10).

Las células linfoides también forman parte del granuloma, principalmente participan linfocitos T CD4+ con perfil pro-inflamatorio (Th1), los cuales rodean el granuloma y producen citocinas como TNF e IFN $\gamma$  las cuales ayudan a mantener la estructura del granuloma (9), también hay linfocitos B y linfocitos T reguladores que producen IL-10, TGF $\beta$  e IL-35 y ayudan a regular la respuesta pro-inflamatoria (11,12). Los granulomas que se forman en el hospedero son heterogéneos entre si con variabilidad en la protección y control de la micobacteria. La

formación de los granulomas es compleja, se han desarrollado diversos modelos *in vitro* y murinos para estudiarlos con el fin de desarrollar terapias dirigidas a mantener la integridad de su estructura (13).

### **Monocitos y Macrófagos.**

Los monocitos son derivados de células progenitoras mieloides producidas en la médula ósea, migran a torrente sanguíneo donde constituyen alrededor del 10% de las células sanguíneas periféricas. En presencia de las quimiocinas atrayentes de monocitos como MCP-1 (también conocido como CCL2) los monocitos migran hacia los tejidos donde se diferencian en macrófagos. Se han descrito en general tres subpoblaciones de monocitos basados en la expresión de CD14 (co-receptor de toll-like receptor 4) y CD16 (Fc gamma receptor IIIa): monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>) (80-95%), intermedios (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) (2-8%), y no clásicos (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup>) (2-11%) (14). Los monocitos clásicos tienen mayor capacidad para fagocitar, diferenciarse a macrófagos o células dendríticas y son proinflamatorios, secretan TNF, expresan mayores niveles del receptor de quimiocina 2 (CCR2) y menos niveles del CX<sub>3</sub> receptor de quimiocina 1 (CX<sub>3</sub>CR1). En el contexto de las infecciones micobacterianas, los monocitos proporcionan información valiosa sobre el estado inmunológico de los pacientes, algunos estudios los han propuesto como biomarcadores para la evaluación de moléculas de expresión como HMBG1 (High-mobility group protein 1), IL-26, CD163 (scavenger receptor) y la combinación de CD64, LTF y RaB33a en monocitos de pacientes con TB (14).

Los macrófagos son células derivadas de monocitos, pertenecen al sistema fagocítico mononuclear, son células presentadoras de antígenos y producen diversas citocinas. Los macrófagos especializados en los tejidos, originados en su mayoría durante la etapa embrionaria se nombran conforme a su localización: *macrófagos intestinales* en los intestinos, *macrófagos alveolares* en el pulmón, *histiocitos* en los tejidos conectivos, *células de Kupffer* en el hígado, *células mesangiales* en el riñón, *células microgliales* en el cerebro y *osteoclastos* en el hueso. De manera simplificada, los macrófagos se clasifican en dos subpoblaciones de acuerdo al microambiente expuesto, los macrófagos activados clásicamente (M1) se diferencian por estímulos como lipopolisacáridos (LPS), IFN $\gamma$  y por el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), producen citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-18,

IL-12), expresan altos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) y de CD68, CD80 y CD86; por el contrario, los macrófagos activados alternativamente (M2), se diferencian a partir de estímulos como el factor estimulante de colonias (CSF-1), IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-13, infecciones por helmintos y hongos, los M2 secretan citocinas anti-inflamatorias como IL-4 y Arginasa-1 y expresan marcadores de superficie como CD200R, CD163, CD206 e IL-4R. En general los macrófagos M1 son parte de la respuesta Th1 se han asociado con enfermedades autoinmunes, obesidad y procesos infecciosos (10). Los macrófagos M2 forman parte la respuesta Th2, predominan en enfermedades alérgicas, parasitosis y se han identificado durante la angiogénesis y remodelación de tejidos dañados (15).

Aunque la evidencia experimental sobre las subpoblaciones M1 y M2 es abundante, recientemente han sido descritas otras subpoblaciones de macrófagos que aún requiere de más estudios para conocer integralmente sus características. Algunas de estas subpoblaciones son: macrófagos asociados a tumores (TAM por sus siglas en inglés) que inducen angiogénesis, linfogénesis, remodelación del estroma, supresión inmune y metástasis, tienen un perfil dual de M1 y M2 ya que comparten con producción de IL-10 e IFN $\gamma$ . La presencia de los TAM se ha asociado con peor pronóstico en ciertos tumores. Los macrófagos CD169+ predominan en la médula y cápsula de ganglios linfáticos y en la zona marginal del bazo, estos macrófagos no fagocitan pero son importantes reguladores de la eritropoyesis, se han relacionado a trastornos hematológicos y en glomerulonefritis. De manera más reciente fue descrita una nueva población de macrófagos que expresan el receptor de células T (TCR) (10).

### **El complejo TCR/CD3**

El TCR es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, estructuralmente es un heterodímero compuesto de dos cadenas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ , cada cadena tiene dos dominios con un enlace disulfuro intracatenario que abarca 60 a 75 aminoácidos, presentan un dominio variable y otro constante, tiene una región transmembranal corta de 21 o 22 aminoácidos con carga positiva, esta región interacciona con los residuos del complejo CD3 que continen aminoácidos con carga negativa. El receptor TCR $\alpha\beta$  se expresa del 90 a 99% de los linfocitos, mientras que el TCR $\gamma\delta$  sólo del 1 al 10%. La molécula CD3 esta conformado por 2 heterodímeros: cadenas  $\gamma\epsilon$ , cadenas  $\delta\epsilon$  y un homodímero cadena  $\zeta\zeta$  (16).



El complejo TCR/CD3 induce un cambio en la conformación de la cadena CD3 $\epsilon$  exponiendo secuencias ricas en prolina (PRS), la molécula Nck es reclutado a los PRS, posteriormente Lck es asociado con Nck y activa el TCR, mediando la fosforilación de los dominios motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM por sus siglas en inglés), presentes en los tallos citoplasmáticas del CD3 $\zeta\zeta$ , de esta forma se recluta a la proteína ZAP-70 y finalmente ocurre una cascada de señalización para fosforilar a LAT y SLP-76 para culminar con el proceso de activación, proliferación y diferenciación de las células (17). El TCR $\alpha\beta$  tiene un alto grado de especificidad e interactúa con antígenos peptídicos procesados y presentados a través de las MHC clase I y II en la superficie de las células presentadoras de antígeno (18,19).

A nivel génico, las cadenas  $\beta\gamma$  del TCR están localizadas en el cromosoma 7 y las cadena  $\alpha\delta$  en el cromosoma 14, la región variable del TCR para el reconocimiento de antígenos se genera por un reordenamientos de los segmentos V (variable), D (diversity) y J (joining) similar al reordenamiento para la generación de los anticuerpos, la función del TCR se ha descrito principalmente para el reconocimiento de antígenos y no para la señalización, por lo que su interacción con el CD3 es fundamental para activar las vías de señalización intracelulares (17).

### **El TNF, y receptor 1 y 2 del TNF (TNFR1 y TNFR2, respectivamente)**

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citocina proinflamatoria producida por diferentes células del sistema inmune: monocitos, macrófagos, células T y B. Inicialmente es sintetizada como una proteína transmembranal (tmTNF) que se expresa en homotrímeros estables. De la forma transmembranal se forma la forma soluble (sTNF) una citocina homotrimérica de 51kDa, la forma tmTNF es escindida de la membrana celular por la acción proteolítica de la enzima de conversión de la metaloproteasa del TNF (TACE) (18).

El TNF ha sido ampliamente descrito como una citocina pro-inflamatoria, sin embargo, esta función es atribuida principalmente a la forma sTNF. Ambas formas del TNF pueden interactuar tanto con TNFR1 como con TNFR2 para inducir activación celular, además los receptores también pueden encontrarse en forma soluble o de membrana (20). Se ha descrito que en la vía de señalización del TNFR1 se recluta el receptor del TNF asociado a factor 2 (TRAF2) y activa a al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B

activadas (NFκB), además también tiene un dominio de muerte asociado al TNFR1 (TRADD) que activa caspasa 8 para inducir apoptosis. Por otro lado, se ha descrito que la vía de señalización de TNFR2 recluta al complejo TRAF2-cIAP1/2, que es relevante para inducir también la activación de NFκB, pero en contraste con TNFR1, TNFR2 no tiene dominio de muerte y no solo estimula la translocación de NFκB por el complejo IκB kinasa (IKK) por la vía clásica, sino también usa vías alternativas (20,21). Se ha descrito que la señalización de TNFR2 puede inducir citotoxicidad y proliferación de células linfoides, evidencia experimental reciente ha mostrado que las células supresoras de origen mieloide (MDSC) requieren de la interacción del tmTNF (expresado en MDSC) con tmTNFR2 (expresado en linfocitos T CD4+) para llevar a cabo su función supresora, sugiriendo que esta interacción regula procesos inflamatorios exacerbados (22).

En el contexto de la TB, el TNF tiene un papel esencial en su inmunopatogénesis, estudios experimentales han demostrado que el bloqueo del TNF o sus receptores afecta la formación del granuloma, en un modelo murino de TB pleural se observó que ratones TNF<sup>-/-</sup> y TNFR1-R2<sup>-/-</sup> no forman granulomas, presentan una inflamación exacerbada y los animales mueren como consecuencia de una infección diseminada (23). Estudios clínicos y epidemiológicos también han reportado que el uso de terapias anti-TNF (adalimumab, infliximab, y etarnecept) incrementa el riesgo de reactivación de TB en enfermedades como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y otras enfermedades inflamatorias crónicas (24).

### III. ANTECEDENTES

La subpoblación de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ + fue descrita por primera vez en sangre periférica de sujetos sanos en el 2011 por Beham y cols., ellos demostraron que 5% de los monocitos de circulación sanguínea son TCR $\alpha\beta$ +, también identificaron macrófagos TCR $\alpha\beta$ + que predominaban en la zona epiteloide de los granulomas en el parénquima pulmonar de sujetos con TB pulmonar activa. Los autores también utilizaron un modelo de infección *in vitro* con BCG y demostraron que el porcentaje de macrófagos TCR+ incrementaba hasta cuatro veces y que al inhibir el TNF con un fármaco anti-TNF (infiximab), la población de macrófagos TCR+ disminuía significativamente. En este estudio, concluyeron que los macrófagos TCR $\alpha\beta$ + forman parte del granuloma en pacientes con tuberculosis pulmonar y que el TNF juega un papel primordial para mantener esta subpoblación celular (25).

En años subsecuentes Fuchs T y cols., describieron que macrófagos TCR+ están presentes en otras patologías como en aterosclerosis y algunos tumores. En placas ateromatosas de las carótidas, se identificaron macrófagos espumosos positivos para TCR $\alpha\beta$ + y en un modelo murino de aterosclerosis también se comprobó la acumulación de éstos en las capas de la pared vascular de las carótidas (26). En tejidos de carcinomas (cáncer de esófago, cáncer de colon y en metástasis de cáncer colorrectal) se encontraron que más del 40% de la población de macrófagos expresaban TCR $\alpha\beta$ + (27).

Recientemente, en el Laboratorio de Inmunología Integrativa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), en un modelo murino de infección sistémica con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) se observó un incremento de las células mieloides CD3+ y se identificó la presencia de dos subpoblaciones mieloides CD3+, una que co-expresa el TCR (CD11b+CD3+TCR $\alpha\beta$ +) y otra negativa al TCR (CD11b+CD3+TCR $\alpha\beta$ -). Además, los datos sugieren que el reclutamiento de células mieloides CD3+TCR $\alpha\beta$ - depende de la presencia del TNFR1 y ambas subpoblaciones fagocitan a la micobacteria secretando citocinas como TNF, IL-6 e IL-10 (28). En otro estudio demostraron que en macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sujetos sanos, existen también dos subpoblaciones de macrófagos CD3+: CD3+TCR $\alpha\beta$ + y CD3+TCR $\alpha\beta$ -, las cuales expresan moléculas como HLA-I, HLA-II y Receptor de Manosa, además secretan un perfil pro-inflamatorio diferente inducido por la vía de

activación dependiente de CD3 y tmTNF: los macrófagos CD3+TCR $\alpha\beta$ + liberan mayor IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e IP-10, mientras que los CD3+TCR $\alpha\beta$ - liberan INF $\gamma$ , TNF y MIP1 $\beta$ . De acuerdo a la expresión de las moléculas, se sugiere que estos macrófagos también tengan funciones similares a los clásicos como presentadores de antígenos y fagocitosis, además al activarse con anti-CD3 y anti-TNF liberan un perfil de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, que podrían estar facilitando la migración de células al sitio de la infección. En este mismo estudio utilizando un modelo de TB pleural con infección con BCG se sugiere que el tmTNF, y no la forma sTNF, es indispensable para mantener la presencia de células mieloides CD3+ en el sitio de la infección (29).

En suma, estos datos sugieren que los monocitos CD3+ son relevantes durante las infecciones micobacterianas, y su presencia aparentemente es dependiente de la vía de las moléculas del TNF. Al momento, no hay estudios que evalúen la frecuencia de los monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ + / TCR $\alpha\beta$ - que se encuentran en circulación sanguínea en pacientes con TB pulmonar, y no se conoce si esta subpoblación puede relacionarse con la evolución clínica durante el tratamiento anti-tuberculosis.

#### **IV. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

La TB es la principal causa de muerte por un agente infeccioso a nivel global. A pesar de los avances en la investigación, el tratamiento disponible es prolongado y han incrementado los casos con resistencia a los fármacos. Parte de la limitante para combatir la enfermedad es la complejidad de su inmunopatogénesis. La descripción de nuevas subpoblaciones celulares como los monocitos CD3+ aporta conocimiento acerca de la respuesta inmune de esta enfermedad.

#### **V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la frecuencia de la subpoblación de monocitos CD3+ TCR $\alpha\beta$ + / TCR $\alpha\beta$ - en pacientes con tuberculosis pulmonar durante el tratamiento anti-tuberculosis?

## **VI. JUSTIFICACIÓN**

El incremento de las poblaciones de monocitos durante la infección por tuberculosis, es de gran interés por el rol que tienen para diferenciarse en macrófagos en el parénquima pulmonar, los cuales son fundamentales para la formación de granuloma y consecuente control de la enfermedad. Al momento, no existen estudios que evalúen el comportamiento de las subpoblaciones de monocitos CD3+ TCRαβ+/TCRαβ- durante la evolución clínica.

## **VII. HIPÓTESIS**

Las subpoblaciones de monocitos CD3+TCRαβ+/TCR αβ- en pacientes con tuberculosis pulmonar disminuyen posterior al tratamiento anti-tuberculosis

## **/III. OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar las subpoblaciones de monocitos CD3+TCRαβ+/TCRαβ- durante el tratamiento anti-tuberculosis.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar fenotípicamente las subpoblaciones celulares de monocitos con anticuerpos de membrana dirigidos contra CD14, CD3 y TCRαβ.
2. Cuantificar la frecuencia de las moléculas presentadoras de antígeno: CD1a, CD1b, CD1c, C1d, que expresan las subpoblaciones de monocitos CD3+TCRαβ+/TCRαβ-.
3. Cuantificar la presencia de las moléculas de la vía del TNF: tmTNF y sus receptores transmembranales (tmTNFR1 y tmTNFR2) en las subpoblaciones de monocitos CD3+ TCRαβ +/TCRαβ-.
4. Medir en plasma las citocinas proinflamatorias: TNF, IFNγ e IL-1β
5. Medir en plasma las formas solubles de los receptores del TNF: sTNFR1 y sTNFR2
6. Medir en plasma las quimiocinas: MCP-1 e IP-10

## **IX.MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio**

Estudio tipo cohorte.

Prospectivo, longitudinal.

### **Lugar del estudio**

Laboratorio de Inmunología Integrativa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Servicio Clínico 2 y Clínica de Tuberculosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

### **Descripción de la población**

#### **Población por estudiar:**

Sujetos mayores de 18 años con diagnóstico de TB pulmonar, diagnosticado por muestra biológica pulmonar (expectoración, biopsia pulmonar o lavado bronquioloalveolar) y que cuenten con prueba de baciloscopia positiva o con GeneXpert/MTB positivo y con cultivo positivo de *M. tuberculosis*.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

### **Criterios de inclusión**

1. Sujetos mayores de 18 años en quien se establece el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

### **Criterios de exclusión**

1. Enfermedad neoplásica
2. Infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana.
3. Enfermedades reumatológicas
4. Insuficiencia Renal Crónica

### **Criterios de eliminación**

1. Pacientes que presenten reacciones adversas graves a los fármacos anti-tuberculosis.
2. Pérdida de seguimiento.
3. Muerte.

## **Número necesario de sujetos de investigación**

Se consideró una muestra a conveniencia de 20 sujetos.

## **Población de estudio**

El periodo de reclutamiento se realizó del 30 de abril 2018 al 30 de enero de 2019. Se invitó a participar al estudio, a sujetos mayores de 18 años con diagnóstico de TB pulmonar que acudieron a urgencias y hospitalizados en el INER, sin tratamiento anti-TB al momento del inicio del estudio. Posterior a la valoración de los criterios de selección se firmó el consentimiento informado, se programó para toma de muestra en el Laboratorio Clínico del INER y se dieron citas de seguimiento en la Clínica de Tuberculosis a los 2 y 6 meses de tratamiento posterior al inicio del tratamiento anti-tuberculosis.

Adicionalmente se incluyó un grupo control de 5 donadores sanos, partimos de concentrados leucocitarios de personas que acudieron al banco de sangre del INER.

## **Toma de muestra**

En el Laboratorio Clínico del INER fue realizada la toma de muestra, se realizó asepsia del área a puncionar, con uso de material estéril se tomaron 24 ml de sangre periférica venosa; 16 ml se recolectaron en 2 tubos BD Vacutainer® CPT (cell preparation tube with sodium heparin) de 8 ml c/u para investigación; 4 ml se recolectaron en tubo con EDTA (medición de biometría hemática y hemoglobina glicosilada) y 4 ml en tubos sin anticoagulante (medición glucosa, creatinina, urea, BUN, proteínas totales, albúmina, bilirrubinas, transaminasas, deshidrogenasa láctica y fosfatasa alcalina). Los tubos de CPT se trasladaron a temperatura ambiente en recipiente hermético al Laboratorio de Inmunología Integrativa del INER, en un tiempo no mayor a 30 min para ser procesados.

## **Obtención de Células Mononucleares (CMNs)**

Las CMNs fueron separadas de la muestra de sangre periférica usando tubos de BD Vacutainer® CPT, se procesaron a temperatura ambiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se centrifugaron a 1800xg durante 30 min, posteriormente se tomaron 2 ml de plasma y se almacenaron en alícuotas a -70°C. Del tubo CPT se obtuvieron la capa de CMNs y se realizó un lavado añadiendo 10 ml de buffer fosfato salino (PBS) al 1% (PBS: 8.06g NaCl,

0.22g KCL, 1.15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.24). La viabilidad celular se midió utilizando azul de tripano en el sistema TC20® (Biorad), las CMNs se almacenaron con suero fetal bovino (SFB) más dimetilsulfóxido (DMSO), con una relación del 90% y 10% respectivamente, a -70° C en tanque de nitrógeno líquido.

### **Inmunofenotipificación por citometría de flujo**

Las frecuencias de las subpoblaciones fueron analizadas por citometría de flujo. El procedimiento consistió en descongelar las CMNs, se lavaron con PBS al 1% a 500xg por 5 min y se procedió a la tinción de viabilidad de acuerdo a las instrucciones del fabricante con el kit Zombie Red™ (PE-TEXAS-RED) BioLegend. Posteriormente se realizó la tinción celular por 30 min a 4°C con anticuerpos de superficie conjugados con fluorocromos: CD3 (APCy7) Clona HIT3a, CD14(BV510) Clona M5E2, HLA-DR (FITC) Clona L243, TCR $\alpha\beta$ (BV421) Clona IP26, TCR $\gamma\delta$ (PE)BD Clona B1 , CD1a(PeCy5) Clona HI149, CD1b(FITC)BD Clona M-T101, CD1c (PerCP) Clona L161, CD1d (PE)BD CD1d42, tmTNF (APC) Clona MA11, TNFR1/CD120a (PE) Clona W15099A y TNFR2/CD120b (PEC y 7) Clona 3G7A02 BioLegend (ver Tabla 1 de Anexo). Las células fueron fijadas con formaldehído al 2%, se lavaron con Buffer de Tinción Celular® (BioLegend), finalmente se analizaron en el citómetro de flujo. Al menos 50,000 eventos fueron adquiridos por cada muestra. Los datos fueron recolectados con el citómetro FACS ARIA II (BD) y se analizaron con el software Flow Jo (Tree Star).

### **Evaluación de citocinas mediante Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)**

Los niveles de citocinas fueron medidos en plasma mediante técnica de ELISA. Se utilizaron los kits Human IFN $\gamma$ -ELISA Max Deluxe Set (Cat 430104 BioLegend), Human TNF-ELISA Max Deluxe (Cat 430201 BioLegend), Human IL1 $\beta$ -ELISA Max Deluxe Set (Cat. 437004 BioLegend), Human MCP-1/CCL2 ELISA Max Deluxe Set (Cat 438804 BioLegend), IP-10 (Cat 439904 BioLegend), TNFRI (Cat DY225-05 R&D Systems) y TNFRII (Cat DY726 R&D Systems) (ver Tabla 2 de Anexo), en todos los casos se siguieron las instrucciones de acuerdo al fabricante.



## X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes. Las variables continuas se expresaron como media  $\pm$  error estándar (ES) o mediana e intervalo intercuartilar (IQR 25-75). Para evaluar la normalidad en los datos, utilizamos el test D'Agostino-Pearson. Para evaluar las diferencias entre más de dos grupos se utilizó ANOVA de 2 vías con corrección de Bonferroni en comparaciones múltiples para muestras paramétricas y Kruskal-Wallis con corrección de Dunn para comparaciones múltiples en muestras no paramétricas. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  a dos colas. Los resultados se analizaron con el software GraphPad Prism (versión 5.3)

## XI. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio de investigación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas, en la Ciudad de México, México con la clave INER/CEI/B0718.

Los investigadores fueron responsables de asegurar que el estudio se realizara de acuerdo con el protocolo, los lineamientos actuales de la Buenas Prácticas Clínicas (GCP) y los requisitos de regulación pertinentes. La GCP es un estándar de calidad científica y ética internacional, para diseñar, conducir, registrar y reportar estudios que incluyan la participación de sujetos humanos. La adherencia a este estándar ofrece el aseguramiento público de que los derechos, la seguridad y el bienestar de los sujetos del estudio están protegidos, lo que es congruente con los principios que se originaron en la Declaración de Helsinki, y de que los datos del estudio clínico son veraces. Cada sujeto dio su consentimiento informado por escrito, de acuerdo con los requisitos locales, después de que se le explicó completamente la naturaleza del estudio. La recolección y el procesamiento de datos personales de los sujetos enrolados en este estudio se limitarán a aquellos datos necesarios para los fines de esta investigación. Se mantuvo en todo momento la confidencialidad de los datos de los sujetos incluidos.

**Investigación con riesgo mínimo** de acuerdo con lo establecido en el Art. 17 del REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

## XII. RESULTADOS

### a. Características clínicas de los participantes.

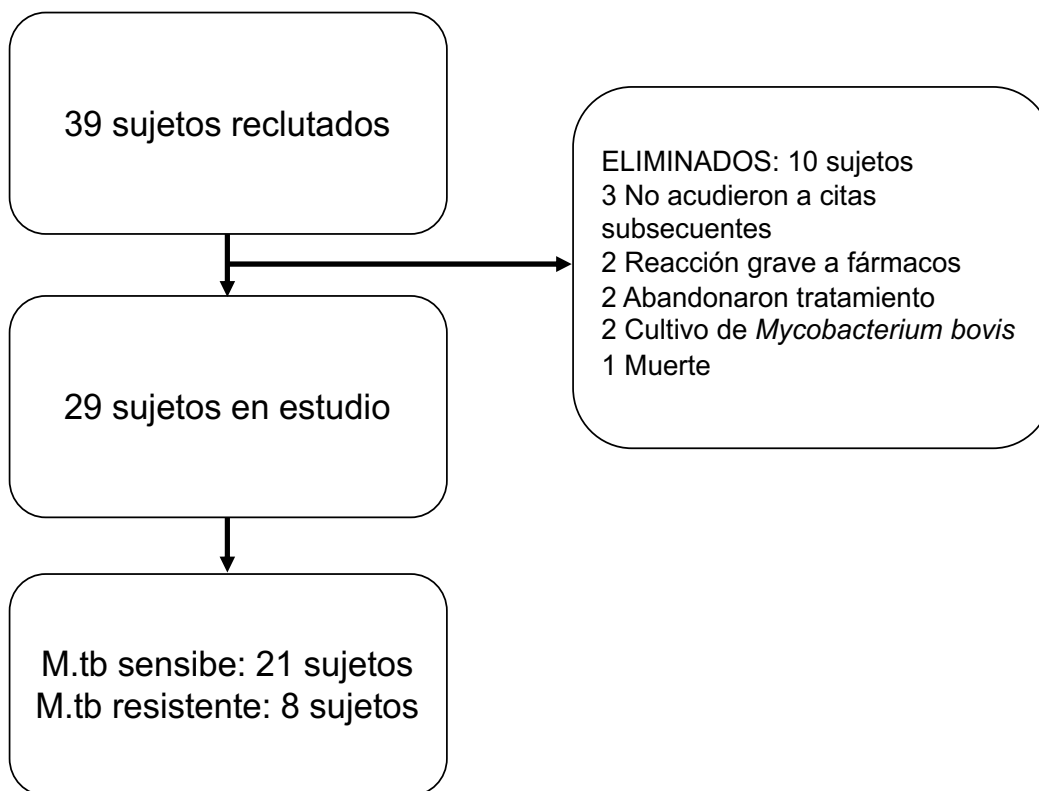
Se reclutaron 39 sujetos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, 10 sujetos fueron eliminados: 3 por pérdida de seguimiento, 2 presentaron reacciones adversas al tratamiento anti-TB (Síndrome de DRESS, intolerancia a la vía oral), 1 por defunción, 2 abandonaron tratamiento anti-TB y en 2 sujetos se aisló cultivo de *Mycobacterium bovis*. De los 29 sujetos incluidos en el estudio, 21 (72%) tuvieron cultivo de M.tb positivo pansensible y 8 (28%) tenían resistencia a algún fármaco de primera línea (rifampicina o isoniacida), en todos los cultivos positivos se realizaron pruebas de farmacosenibilidad (PFS) (Figura 1).

En total se analizaron 29 sujetos que presentaron una mediana de edad de 41 (27-47) años, 16 (55%) mujeres y 13 (45%) hombres. La comorbilidad más frecuente diagnosticada fue diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en 11 (38%) sujetos, el resto de las características basales de la población de estudio se describen en la Tabla 1. Durante el seguimiento de los pacientes se realizó baciloscopias y cultivo de micobacterias, al final del tratamiento se pudo catalogar como curado al 82%(24) de los sujetos con cultivo negativo para M.tb, en 4 (14%) sujetos no fue posible obtener muestra de expectoración al final del tratamiento, sin embargo tuvieron mejoría clínica y radiológica durante el seguimiento, por lo que fueron catalogados como término de tratamiento, sólo 1 (4%) paciente con TB sensible a los 6 meses presentó cultivo M.tb positivo, por lo que se decidió alargar la fase de mantenimiento, a los 9 meses de tratamiento anti-TB, finalmente se reportó el cultivo negativo y se catalogó como curado, el resto de las características microbiológicas se describen en la Tabla 2.

Cabe señalar que en nuestro estudio de los 4 sujetos que tuvieron baciloscopias positivas al segundo mes, 1 sujeto tuvo crecimiento de *M.chelonae*, en 1 sujeto no creció M.tb y en 2 si se reportó cultivo positivo para M.tb, por otra parte en otros 3 sujetos con baciloscopias negativas se reportó cultivo positivo M.tb. En total de los 5 sujetos con cultivo positivo de M.tb a los 2 meses, 2 de estos sujetos tenían TB farmacorresistente, 2 DM2, 4 sujetos tenían lesiones cavitarias y 1 sujeto tenía antecedente de alcoholismo y desnutrición (IMC16 kg/m<sup>2</sup>).

Con respecto al tratamiento, los pacientes con TB pulmonar sensible recibieron el esquema de acuerdo a la NOM-006-SSA2-2013 que consiste en 2 meses fase intensiva: rifampicina (R), isoniacida (H), pirazinamida (Z) y etambutol (E) y 4 meses de fase de mantenimiento con R e H, con estrategia de tratamiento acortado estrictamente supervisada (TAES). Los pacientes con TB pulmonar farmacorresistente recibieron tratamiento de acuerdo con las recomendaciones internacionales de la OMS y dictaminado por el grupo Grupo Asesor Nacional de Farmacorresistencia (GANAFAR) de la Secretaría de Salud. En la Tabla 3 del Anexo se describe el patrón de resistencia y el tratamiento de los casos TB farmacorresistentes.

**Figura 1. Diagrama de flujo de los sujetos evaluados en el estudio.**



**Tabla 1. Características clínicas y demográficas basales de la población.**

| <b>Variables</b>      | <b>Total n= 29</b> | <b>Valores de Referencia</b>                   |
|-----------------------|--------------------|--|
| Edad (años)           | 41 (27-47)         |  |
| Mujeres/Hombres n(%)  | 16(55%)/13(45%)    |  |
| DM2 n(%)              | 11 (38%)           |  |
| Alcoholismo n(%)      | 2 (7%)             |  |
| Tabaquismo n(%)       | 9 (31%)            |  |
| EHL n(%)              | 9 (31%)            |  |
| IMC kg/m <sup>2</sup> | 21.4 (18-23)       |  |
| Leucocitos            | 10 (8 -13)         | 4 - 10 x10 <sup>3</sup> cells/mm <sup>3</sup>  |
| Neutrófilos           | 7.9 (6 -10)        | 2 - 7.5 x10 <sup>3</sup> cells/mm <sup>3</sup> |
| Linfocitos            | 1.5 (1-1.8)        | 1 - 4 x10 <sup>3</sup> cells/mm <sup>3</sup>   |
| Hemoglobina           | 12.5 (11-14)       | 11.5-17 mg/dL                                  |
| Glucosa               | 104 (92-145)       | 74-106 mg/dL                                   |
| Creatinina            | 0.7 (0.5-0.9)      | 0.7-1.20 mg/dL                                 |
| Hb glicosilada%       | 6.3 (5.6-9.5)      |  |
| Albúmina              | 3.3 (3-4)          | 3.5 - 4.8 mg/dL                                |
| TGO                   | 18 (13-26)         | 14-64 UI/L                                     |
| TGP                   | 17 (11-25)         | 15-41 UI/L                                     |
| DHL                   | 162 (143-181)      | 98 -192 U/L                                    |
| FA                    | 92 (79-109)        |  |

Los datos fueron representados con numero con % (porcentajes), mediana e intervalo intercuartil (IQR 25-75). Abreviaturas: DM2= diabetes mellitus tipo 2, EHL=exposición a humo de leña, IMC= Índice de masa corporal, Hb = hemoglobina, TGO= transaminasa glutámico-oxalacética. TGP= transaminasa glutámico-pirúvica DHL= deshidrogenasa láctica.

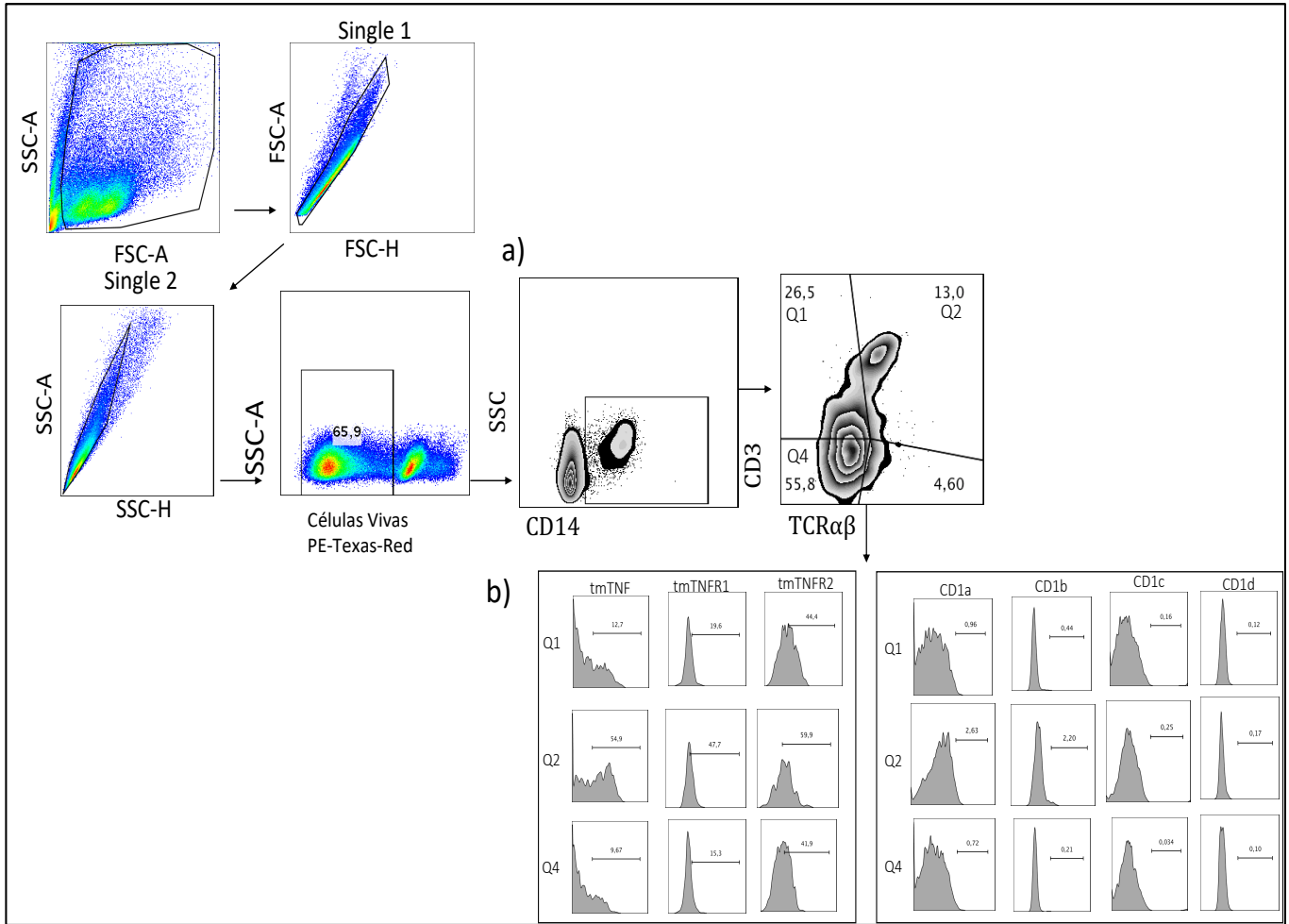
**Tabla 2. Características microbiológicas de los pacientes en estudio.**

| N=29                                     | Basal     | 2 meses  | 6 meses  |
|--|-----------|----------|----------|
| <b>Baciloscopia</b>                      |           |          |          |
| Negativa                                 | 5 (17%)   | 20 (68%) | 24 (82%) |
| 1+                                       | 4 (14%)   | 2 (7%)   | 0        |
| 2++                                      | 5( 17%)   | 1 (4%)   | 0        |
| 3+++                                     | 15( 52%)  | 1 (4%)   | 1 (4%)   |
| No se realizó                            | 0         | 5 (17%)  | 4(14%)   |
| <b>GeneXpert MTB/RIF</b>                 |           |          |          |
| MTB (+) RIF (-)                          | 14 (49%)  |          |          |
| MTB (+) RIF (+)                          | 6 (20%)   |          |          |
| MTB (-) RIF (-)                          | 2 (7%)    |          |          |
| No se realizó                            | 7 (24%)   |          |          |
| <b>Cultivo de <i>M. tuberculosis</i></b> |           |          |          |
| Positivo (+)                             | 29 (100%) | 5 (17%)  | 1 (4%)   |
| Negativo (-)                             | 0         | 19 (66%) | 24 (82%) |
| No se realizó                            | 0         | 5 (17%)  | 4(14%)   |
| <b>Otros microorganismos aislados</b>    |           |          |          |
| <i>C. Immitis</i>                        | 1 (3.5%)  |          |          |
| <i>M. Chelonae</i>                       |           | 1 (4%)   | 1 (4%)   |
| <i>M. Fortitum</i>                       |           | 1 (4%)   |          |

**b. Estrategia de análisis para la caracterización fenotípica de monocitos CD14+CD3+TCRαβ+/ TCRαβ- mediante citometría de flujo**

Mediante citometría de flujo se realizó inmunofenotipificación para la cuantificación de las subpoblaciones celulares de monocitos, la estrategia de análisis se presenta en la Figura 2. Inicialmente se delimita la región de células por FSC (forward scatter) contra SSC (side scatter) posteriormente se delimitan las células individuales (singlets) para evitar incluir células que no son doble positivas sino dos células juntas; posteriormente, las células vivas se seleccionaron a partir de la región negativa al colorante PE-Texas Red. Finalmente, se seleccionó la región de células CD14+, dentro de dicha ventana se evaluó la expresión de CD3 y TCRαβ, delimitando

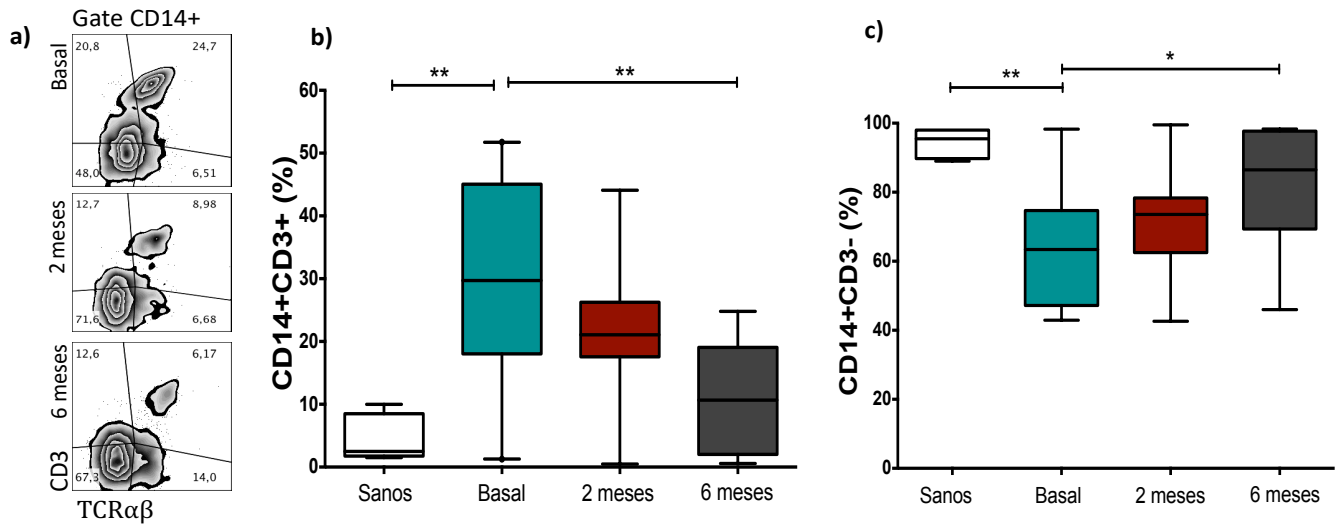
con ello las subpoblaciones de monocitos (Figura 2a). Una vez delimitadas las regiones de monocitos CD3+TCRαβ+, CD3+ TCRαβ- y CD3-, la frecuencia de subpoblaciones de monocitos que co-expresan a las moléculas tmTNF, tmTNFR1, tmTNFR2, CD1a, CD1b, CD1c y CD1d fueron evaluadas (Figura 2b).



**Figura 2. Estrategia de análisis para evaluar las subpoblaciones de monocitos CD3+ así como la co-expresión de moléculas de la vía del TNF y presentadoras de antígeno de origen lipídico. a)** Gráficos de zebra plots representativos de un paciente con TB, se seleccionó la región de células CD14+, dentro de esta población se delimitaron las subpoblaciones de monocitos cuadrantes Q1(CD14+CD3+TCRαβ-),Q2(CD14+CD3+TCRαβ+) y Q4(CD14+CD3-). **b)** Histogramas representativos que muestran la expresión de tmTNF, tmTNFR1 y tmTNFR2 y las moléculas CD1a, CD1b, CD1c, CD1d dentro de cada subpoblación.

**c. Monocitos CD3+ incrementan en pacientes con TB y disminuye en respuesta al tratamiento anti-TB.**

La frecuencia de la subpoblación de monocitos CD3+ está incrementada significativamente en los pacientes con TB al momento del diagnóstico comparado con los sanos, sin embargo esta frecuencia disminuye a los 6 meses de tratamiento anti-TB (Figura 3b). Por el contrario, la frecuencia de monocitos CD3- se encontró disminuida al momento del diagnóstico e incrementó de forma significativa a los 6 meses tratamiento anti-TB, efecto esperado ya que los CD3+ disminuyen (Figura 3c).

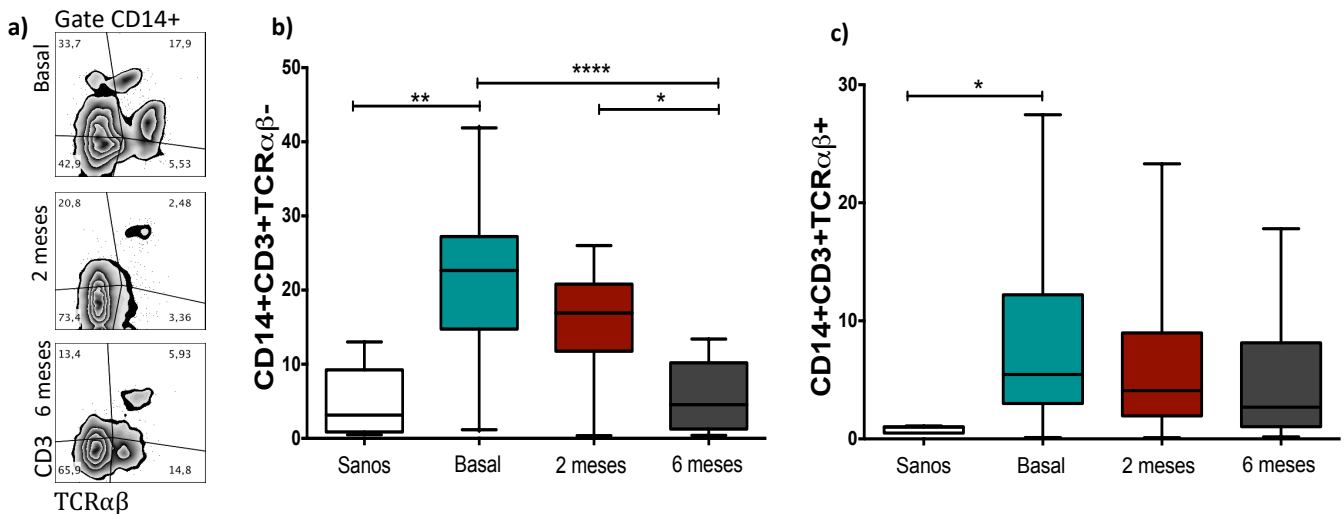


**Figura 3. Incremento de la frecuencia de monocitos CD3+ en pacientes con TB pulmonar.**

**a)** Gráficos de zebra plots representativos de un paciente con TB, del gate de CD14+ se limitaron las poblaciones CD3 y TCR $\alpha\beta$ . **b)** Frecuencia de monocitos CD3+ basal, 2 meses y 6 meses. **c)** Frecuencia de monocitos CD3- basal, 2 meses y 6 meses. Los datos se muestran con gráficos box plot con mediana e IQR (5-95). Sanos=3 TB=20. Análisis estadístico realizado con Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. \*p<0.05 \*\*p<0.01.

**d. Monocitos CD3+TCRαβ-, pero no CD3+TCRαβ+, disminuyen en pacientes con TB en respuesta al tratamiento anti-TB.**

Al comparar dentro de la región de monocitos CD3+ se identificó la co-expresión del TCRαβ, nuestros datos muestran que los pacientes con TB al momento del diagnóstico tienen incrementada la frecuencia de monocitos CD3+TCRαβ- comparado a los sujetos sanos, interesantemente esta frecuencia disminuye en respuesta al tratamiento anti-TB (Figura 4b). La subpoblación de monocitos CD3+TCRαβ+ está incrementada en los pacientes con TB al momento del diagnóstico, sin embargo, esta subpoblación no disminuye de manera significativa en respuesta al tratamiento anti-TB (Figura 4c).

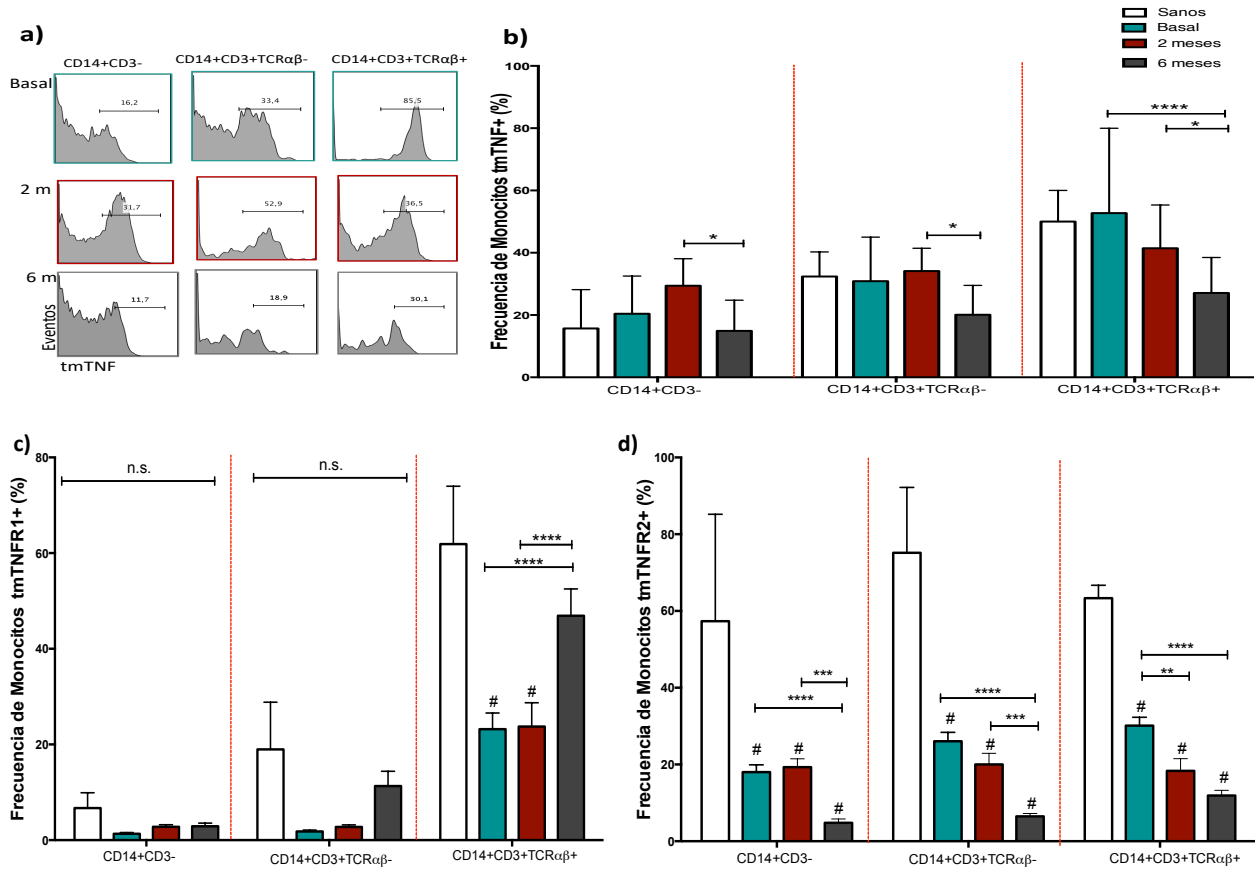


**Figura 4. Los monocitos CD3+TCRαβ- disminuyeron posterior al tratamiento anti-TB. a)** Gráficos de zebra plots representativos de un paciente con TB en tiempo basal, 2 y 6 meses, dentro el Gate CD14+ se limitaron las poblaciones CD3 y TCRαβ. **b)** Frecuencia de monocitos CD3+TCRαβ+ basal, 2 meses y 6 meses. **c)** Frecuencia de monocitos CD3+TCRαβ- basal, 2 meses y 6 meses. Los datos se muestran con gráficos box plot con mediana e IQR (5-95). Sanos=3 TB=20. Análisis estadístico realizado con Kruskal Wallis con comparaciones múltiples de Dunn \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*\* p<0.0001 .



**e. Durante la TB, la expresión de tmTNF y tmTNFR2 disminuye en las diferentes subpoblaciones de monocitos y no mejora a pesar del tratamiento anti-TB.**

Al momento del diagnóstico, las tres subpoblaciones de monocitos de pacientes con TB expresan una frecuencia similar de tmTNF+ que los monocitos de sujetos sanos, sin embargo, todas las subpoblaciones de monocitos disminuyen de manera significativa su frecuencia de tmTNF+ a los 6 meses de tratamiento anti-TB (Figura 5b). En cuanto a la expresión de los TNFRs, solo los monocitos CD3+TCRαβ+ tienen disminuída la expresión de tmTNFR1 comparado con los sanos y se incrementa a los 6 meses de tratamiento anti-TB (Figura 5c). Interesantemente, la expresión de tmTNFR2 está disminuída en todas las subpoblaciones de monocitos de pacientes con TB comparada con los provenientes de sanos, además en respuesta al tratamiento esta disminución no se invierte, por el contrario, a los 6 meses de tratamiento anti-TB existe una disminución aún más significativa comparada con su basal (Figura 5d).

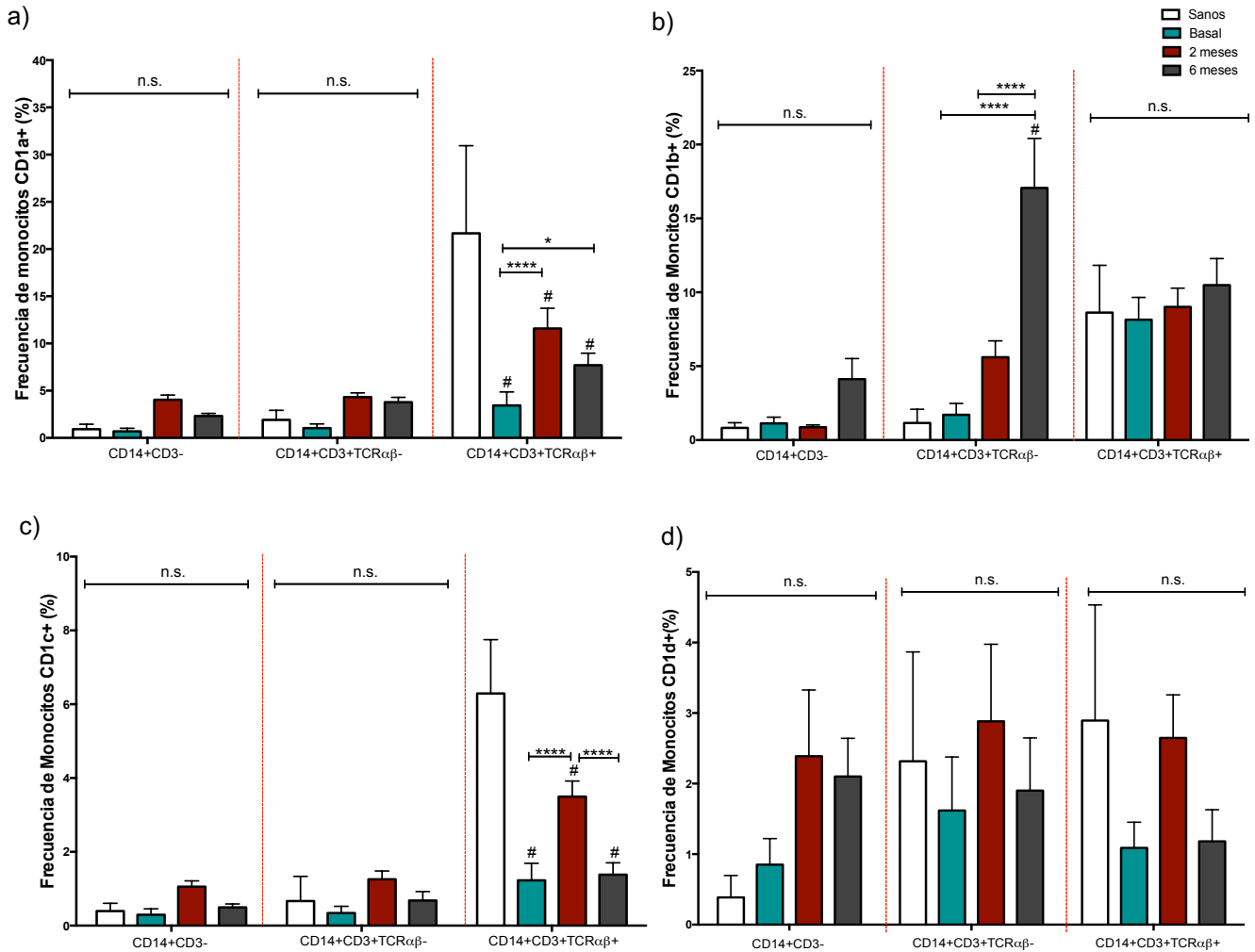


**Figura 5. La expresión de las moléculas de la vía del TNF están modificadas en las subpoblaciones de monocitos. a)** Histogramas representativos de un sujeto con TB que

muestra la la expresión de tmTNF dentro de cada subpoblación en estudio en tiempo basal, 2 y 6 meses. **b)** Frecuencia de monocitos tmTNF+ basal, 2 meses y 6 meses. **c)** Frecuencia de monocitos tmTNFR1+ basal, 2 meses y 6 meses. **d)** Frecuencia de monocitos tmTNFR2+ basal, 2 meses y 6 meses. Los datos se muestran en barras con media + ES (error estándar). Sanos=3 TB=20. Análisis estadístico realizado con ANOVA-2 vías con corrección de Bonferroni. \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (el signo # indica  $p < 0.0001$  comparada con los sujetos sanos).

**f. Durante la TB disminuye la frecuencia de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ + positivos a CD1a y CD1c.**

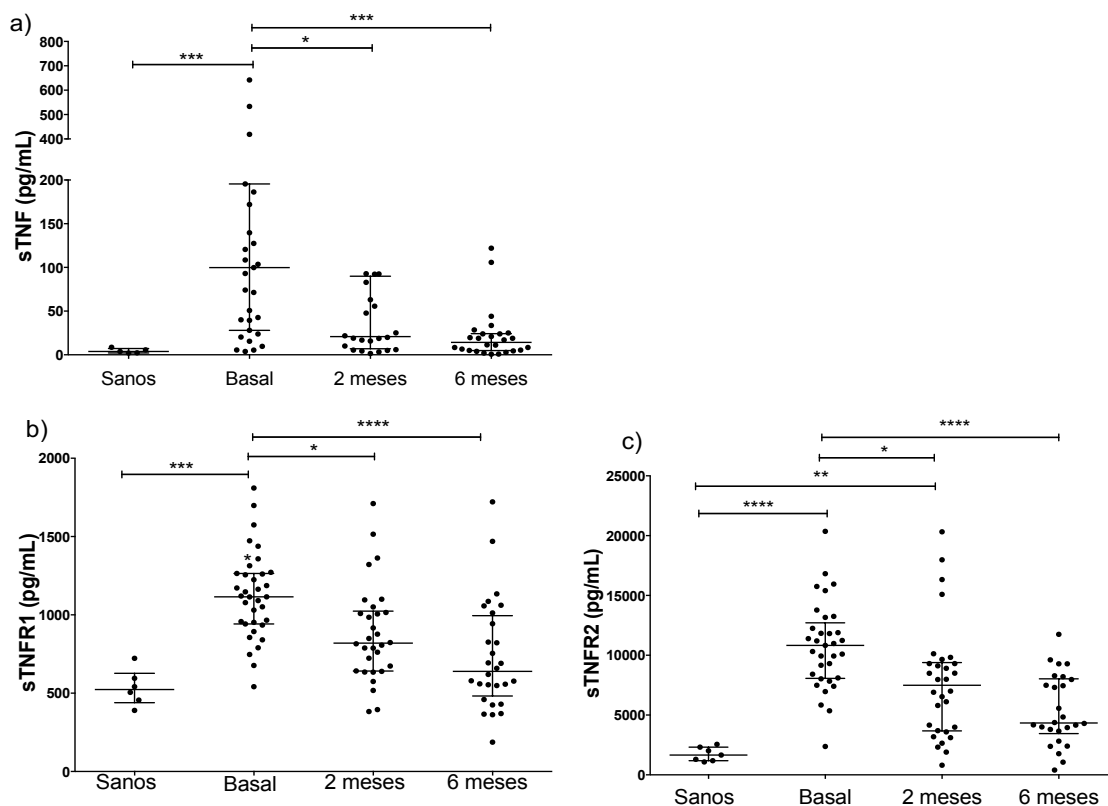
Las moléculas de la familia CD1 son moléculas presentadoras de antígenos de origen lipídico y existen 4 isoformas: CD1a, CD1b, CD1c y CD1d, que pueden ser expresadas en la membrana de células presentadoras de antígeno (30). Se ha descrito que durante la infección por M.tb la expresión de algunas de estas isoformas se encuentra alterada, incluso se ha sugerido el uso de tetrámeros de CD1b para cuantificar células T específicas a lípidos y lograr un diagnóstico oportuno de TB (31). Nuestros datos muestran que en los monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ + la frecuencia de CD1a y CD1c está disminuída comparada con los sanos (Figura 6a y 6c), sin embargo, aunque los monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD1a+ incrementan a los 2 y 6 meses de tratamiento (estadísticamente significativo del basal), este incremento no llega al nivel del que presentan los sujetos sanos (Figura 6a). Mientras que la frecuencia de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ -CD1c+ incrementa a los 2 meses de tratamiento, vuelve a disminuir a los 6 meses (Figura 6c). Por el contrario, la frecuencia de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ -CD1b+ incrementa posterior a 6 meses del tratamiento anti-TB (Figura 6b). Finalmente, la expresión de la isoforma CD1d no se vio afectada en ninguna de las subpoblaciones de monocitos (Figura 6d).



**Figura 6. Disminución de la frecuencia de los monocitos CD3+TCRαβ+CD1a+ y CD3+TCRαβ+CD1c+.** **a)** Frecuencia de monocitos CD1a+ basal, 2 meses y 6 meses **b)** Frecuencia de monocitos CD1b+ basal, 2 meses y 6 meses. **c)** Frecuencia de monocitos CD1c+ basal, 2 meses y 6 meses. **d)** Frecuencia de monocitos CD1d+ basal, 2 meses y 6 meses. Los datos se muestran en barras con media + ES. Sanos=3 TB=20. Análisis estadístico realizado con ANOVA -2 vías con corrección de Bonferroni. \*\*\*\* p<0.0001 (el signo # indica p<0.0001 comparada con los sujetos sanos).

**g. sTNF, sTNFR1 y sTNFR2 incrementan al momento del diagnóstico y disminuyen posterior al tratamiento.**

Debido a que las moléculas de la vía del TNF pueden estar presentes en forma soluble y transmembranal y después de haber identificado que en el transcurso de la respuesta al tratamiento anti-TB, las subpoblaciones de monocitos presentan alteraciones en la expresión de tmTNF, tmTNFR1 y tmTNFR2, evaluamos en plasma la forma soluble de dichas moléculas mediante la técnica de ELISA. Observamos que los niveles de sTNF están incrementados al momento del diagnóstico en pacientes con TB comparado con los sanos y disminuyen a los 2 y 6 meses de tratamiento anti-TB (Figura 7a). De una forma similar, los niveles de sTNFR1 y sTNFR2 también se encuentran incrementados al momento del diagnóstico comparado con los niveles en sanos y disminuyeron a los 2 y 6 meses del tratamiento anti-TB (Figura 7b y 7c, respectivamente).

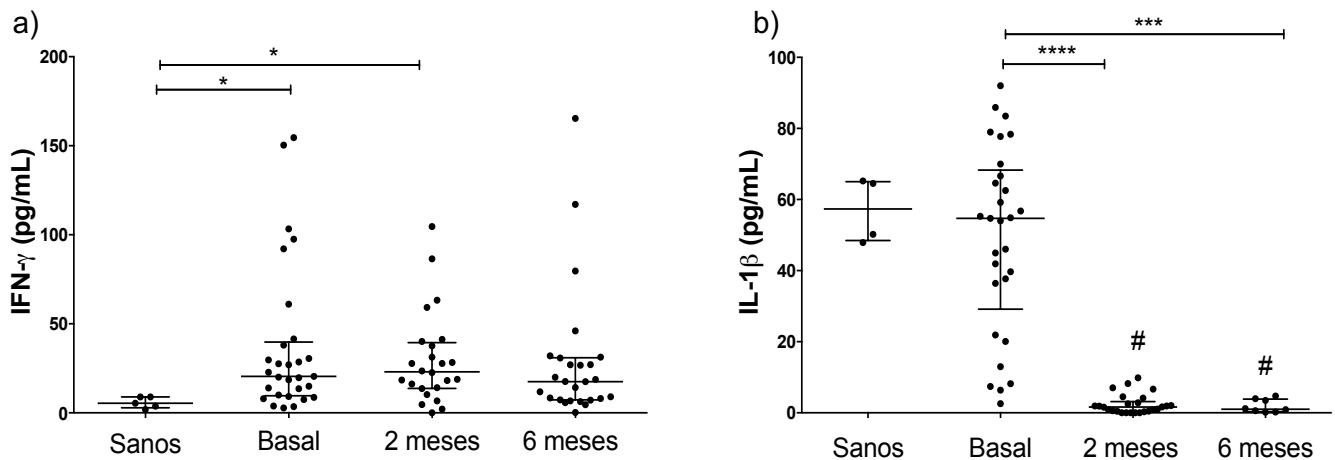


**Figura 7. Disminución de sTNFR1 y sTNFR2 durante el tratamiento anti-TB. a)** Niveles de sTNF basal, 2 meses y 6 meses. **b)** Niveles de sTNFR1 basal, 2 meses y 6 meses. **c)** Niveles de sTNFR2 basal, 2 meses y 6 meses. Datos presentados con gráfico column scatter plots,

mediana e IQR (5-95). Sanos=5 TB=29. Análisis estadístico realizado con *Kruskal Wallis* con comparaciones múltiples de Dunn \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**h. Los niveles de IL-1 $\beta$ , pero no IFN $\gamma$ , disminuyen durante el tratamiento anti-TB.**

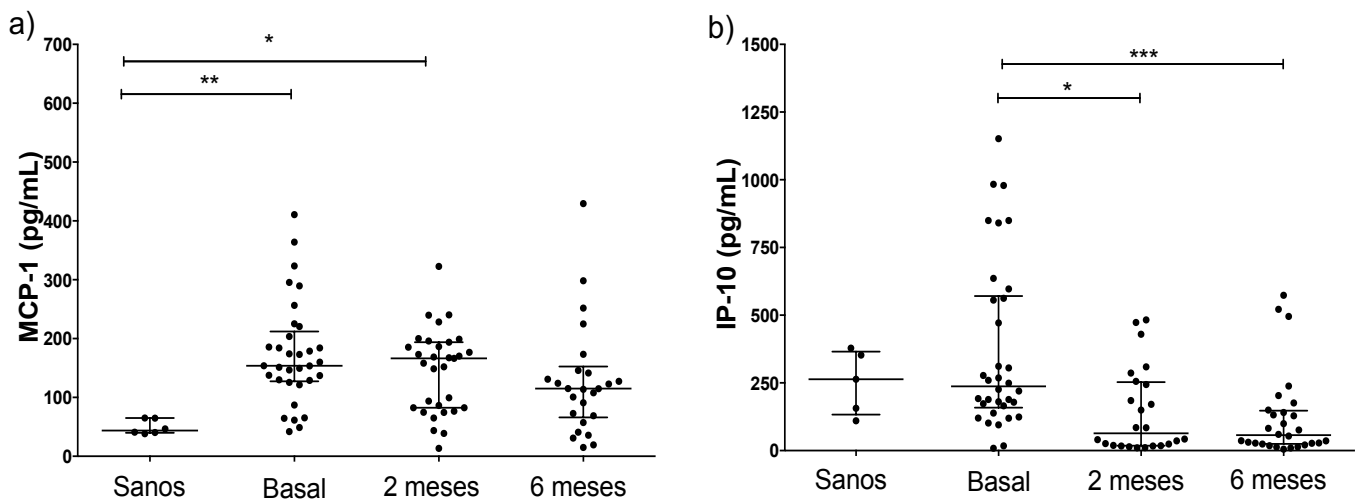
Previamente se ha reportado que durante la TB, la presencia de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  son importantes para el control de la infección. Los monocitos son principales productores de IL-1 $\beta$  y se ha demostrado en modelos murinos de infección por M.tb que la deficiencia de IL-1 incrementa la carga bacilar (32). Actualmente la liberación de IFN $\gamma$  por los linfocitos T es utilizada como biomarcador para TB latente (33), por otra parte recordemos que IFN $\gamma$  induce la maduración de monocitos a macrófagos M1 (10). Nuestros datos muestran que al momento del diagnóstico, los pacientes con TB tienen incrementado los niveles de IFN $\gamma$  comparado con los sanos pero dichos niveles no disminuyen aún a los 2 y 6 meses de tratamiento anti-TB (Figura 8a). Por otro lado, aunque al momento del diagnóstico los niveles de IL-1 $\beta$  no difieren con el valor en sanos, a los 2 y 6 meses de tratamiento estos niveles disminuyeron significativamente (Figura 8b).



**Figura 8. Incremento de IFN $\gamma$  durante la infección por TB y disminución de IL-1  $\beta$  posterior al tratamiento anti-TB. a) Niveles de IFN $\gamma$  basal, 2 meses y 6 meses. b) Niveles de IL-1 $\beta$  basal, 2 meses y 6 meses. Datos presentados con gráfico column scatter plots, mediana e IQR (5-95). Sanos=5 TB=29. Análisis estadístico realizado con *Kruskal Wallis* con comparaciones múltiples de Dunn \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (# $p < 0.01$  indica la diferencia comparada con los sujetos sanos)**

### i. La quimiocina IP-10 disminuye posterior al tratamiento anti-TB.

Para el proceso de migración de los monocitos del torrente sanguíneo al parénquima pulmonar es importante la presencia de quimiocinas como MCP-1 o también llamada CCL2 (quimiocina ligando de CCR2) (34), mientras que la quimiocina IP-10 o también llamada CXCL10 (proteína inducible de interferon gamma de 10 kDa) es liberada en general por las células presentadoras de antígeno y se ha propuesto como un biomarcador para diferenciar TB activa de TB latente (35). Nuestros datos muestran que comparado con los sujetos sanos, al momento del diagnóstico los pacientes con TB tienen incrementados los niveles plasmáticos de MCP-1 y continua incrementado hasta los 2 meses de tratamiento anti-TB (Figura 9a). Por otro lado, los niveles de IP-10 disminuyeron a los 2 y 6 meses posterior al inicio del tratamiento anti-TB comparado con su valor basal, no encontramos diferencia con los niveles de los sanos. (Figura 9b).



**Figura 9. Incremento de MPC-1 al momento del diagnóstico y disminución de IP-10 posterior al tratamiento anti-TB. a) Niveles de MCP-1 basal, 2 meses y 6 meses. b) Niveles de IP-10 basal, 2 meses y 6 meses.** Datos presentados con gráfico column scatter plots, mediana e IQR (5-95). Sanos=5 TB=29. Análisis estadístico realizado con *Kruskal Wallis* con comparaciones múltiples de Dunn \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### XIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio investigamos el comportamiento de la población de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ + durante el tratamiento anti-TB, sugiriendo que estos monocitos podrían ser los precursores de los macrófagos TCR+ que se describieron por Beham y cols. en los granulomas de los pacientes con TB pulmonar activa (25). La expresión del TCR en células de la inmunidad innata no sólo se ha limitado a los monocitos, recientemente neutrófilos TCR+ también se han reportado en pacientes con meningitis bacteriana en la fase aguda de la enfermedad (36).

Hasta el momento, la frecuencia de monocitos con el complejo CD3+TCR $\alpha\beta$ + / TCR $\alpha\beta$ - en sangre periférica en pacientes con TB pulmonar y su comportamiento durante el tratamiento anti-TB no se había descrito. En este trabajo encontramos que los monocitos CD3+ incrementan en los pacientes infectados y disminuyen a los 6 meses de tratamiento anti-TB, sugiriendo que esta población podría ser partícipe en el proceso de la infección por M.tb. Al evaluar además las subpoblaciones de monocitos CD3+, describimos por primera vez que la subpoblación de monocitos que predominan al momento del diagnóstico de TB son los CD3+TCR $\alpha\beta$ - y éstos disminuyen significativamente posterior al tratamiento anti-TB, por otra parte los monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ + se encuentran incrementados al momento del diagnóstico y no observamos cambio durante el tratamiento anti-TB, probablemente ambas poblaciones podrían diferir en sus funciones.

En cuanto a la presencia de las moléculas de la vía del TNF en los monocitos CD3+ en comparación con los monocitos clásicos. Sorpresivamente, observamos que en todas las poblaciones de monocitos el tmTNF+ disminuye hasta los 6 meses de tratamiento y en los monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ +tmTNF+ disminuye a los 2 y 6 meses de tratamiento con respecto a su basal, solamente la frecuencia de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ +tmTNFR1+ se encontró disminuida al momento del diagnóstico comparada con los sanos e incrementó a los 6 meses de tratamiento anti-TB. Aunado a estos resultados, observamos que la expresión del tmTNFR2+ en las diferentes subpoblaciones de monocitos se encuentra disminuida al momento del diagnóstico y continua en niveles bajos a pesar del tratamiento anti-TB. Cabe mencionar que la presencia del TNFR1 en las células mieloides es parte de la respuesta inicial contra la

infección por M.tb y se requiere para el control de la infección (37), por lo sugerimos que la disminución de las moléculas de la vía del TNF en los monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ + podría asociarse con una alteración en la función de estas células.

Nos cuestionamos también acerca de la frecuencia de las moléculas presentadoras de antígenos lipídicos en los monocitos CD3+. Se conoce que M.tb induce a través del TLR-2 (toll like receptor 2) la expresión de las isoformas del grupo 1 de CD1 (CD1a, CD1b y CD1c) en los monocitos y su presencia es un marcador para llevar a cabo el proceso maduración de monocitos a célula dendríticas (38). En nuestro estudio llama la atención que sólo se observó incremento en las isoformas CD1b en los monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ - hasta los 6 meses de tratamiento anti-TB. CD1b tiene la característica particular de presentar lípidos micólicos de la pared de la micobacteria (39). Por otro lado, la frecuencia de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD1a+ y CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD1c+ se encontró disminuida comparada con los controles sanos. CD1a presenta antígenos lipopéptidos como la molécula DDM (dideoxymicobactina) que promueve el crecimiento de M.tb y CD1c presenta otros lípidos específicos (39). La evaluación de estas moléculas es controversial ya que su expresión es baja para la identificación *in vivo* y otros estudios han señalado que M.tb podría bloquear la expresión de las moléculas CD1, como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (40).

Debido a los resultados encontrados en la expresión de las moléculas de la vía del TNF en las diferentes poblaciones de monocitos, evaluamos la forma soluble en plasma. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia del TNF en las células mieloides es necesaria para el control de la infección aguda por M.tb (41) y las formas solubles de sus receptores sTNFR1 y sTNFR2 son también marcadores de la inmunidad innata y adaptativa. Previamente se ha reportado que los niveles de sTNFR1 y sTNFR2 disminuyen de manera significativa después de la fase intensiva de tratamiento anti-TB y el valor basal de sTNFR1 junto con PCR (proteína C reactiva) se han propuesto como biomarcadores predictores para evaluar la respuesta al tratamiento anti-TB (42). En otros estudios, se ha reportado que la expresión de tmTNFR1 está incrementada en linfocitos y monocitos de pacientes con TB pulmonar y los niveles de sTNFR1 son mayores en los pacientes que tienen cultivo positivo para M.tb, asociado con enfermedad severa (43). En nuestros pacientes encontramos que los niveles de sTNF están incrementados



antes del tratamiento anti-TB y disminuyen posterior a los fármacos anti-TB, en cuanto a los niveles de sTNFR1 y sTNFR2, ambos incrementaron basalmente y disminuyeron a los 2 y 6 meses de tratamiento anti-TB. Nuestros resultados concuerdan en parte, con el incremento de los niveles de sTNFR1 reportado previamente en pacientes con M.tb, no obstante, no hay estudios diseñados para evaluar la sensibilidad y especificidad de este posible biomarcador para el seguimiento de los pacientes.

Finalmente, la medición de las citocinas y quimiocinas durante la infección por M.tb, fue de gran relevancia en nuestro estudio, debido a que nos sugiere el microambiente en el que se encuentran los monocitos CD3+ en sangre periférica. IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  además son importantes citocinas que controlan el desenlace de la infección por M.tb y también se han propuesto como alternativas para terapias dirigidas al hospedero (32). En los sujetos evaluados observamos que los niveles de IFN $\gamma$  incrementaron al momento del diagnóstico comparado con los sanos, sin embargo, no fue significativa la disminución durante el seguimiento, observamos que algunos sujetos elevaron a los 6 meses de tratamiento. Los niveles de IFN  $\gamma$  incrementan en respuesta a antígenos de TB, la disminución de las concentraciones de IFN  $\gamma$  podría ser una señal de respuesta al tratamiento, sin embargo, se han reportado que existe variabilidad individual en la respuesta, si bien la mayoría disminuye en los 2 primeros meses, continua siendo detectable hasta las 6 meses de tratamiento, en otros estudios no se ha recomendado como un marcador de seguimiento en la clínica, sino solo como un marcador de diagnóstico (44,45). Por otra parte, los niveles de IL-1 $\beta$ , si disminuyeron a los 2 y 6 meses posterior al tratamiento anti-TB. En otros estudios se ha reportado que IL-1 incrementan basalmente y disminuye al tratamiento por lo que se ha propuesto como marcador para TB activa y para seguimiento (46). La medición de MCP-1 e IP-10 fue relevante en nuestro estudio, debio a que su producción es inducida por la infección en M.tb y su presencia es importante para formación del granuloma (34,47). IP-10 es secretada también por monocitos y macrófagos para atraer linfocitos Th1, se ha propuesto como biomarcador para diagnóstico de TB pulmonar y pleural activa, tiene una sensibilidad y especificidad de 72.4% y 75.9% respectivamente (49). En nuestro estudio IP-10 disminuyó significativamente a los 2 y 6 meses de tratamiento, corroborando una respuesta óptima al tratamiento en nuestros pacientes. Los niveles de MCP-1 incrementaron significativamente al momento del diagnóstico. La presencia de MCP-1 también se ha asociado con la presencia de

monocitos TCR+ (25). En la clínica MCP-1 tiene alta sensibilidad y especificidad (90.3% y 97% respectivamente) como marcador para el diagnóstico de TB pulmonar y pleural activa (49), pero se ha cuestionado como biomarcador de seguimiento, debido a que los niveles de MCP-1 llegan a incrementar posterior al tratamiento. Otros biomarcadores que se han considerado para evaluar la respuesta al tratamiento son las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6, proteínas de fase aguda (SAA1, PTX3, PCT, PCR) y el factor asociado con la reorganización de tejidos (MMP-8) (50).

En los sujetos que tuvieron baciloscopias positivas al segundo mes se documentaron factores de riesgo relacionados con conversión tardía del cultivo, como lesiones cavitadas, farmacoresistencia, diabetes y desnutrición. En estos sujetos no observamos el incremento de un biomarcador en común. Sin embargo, en el sujeto que persistió con cultivo positivo a los 2 y 6 meses de tratamiento, observamos mayores niveles de IP-10 y sTNFR2 a los 2 meses de tratamiento, además los niveles basales de sTNFR1 fueron mayores que el resto de los sujetos y continuaron elevados a los 6 meses de tratamiento anti-TB.

En cuanto a las limitantes de este estudio, debemos considerar que en nuestra población 38% tenían DM2. Previamente se ha reportado en sujetos con DM, los monocitos tienen disminución de la fagocitosis, además la respuesta en las vías de Th1 y Th17 se encuentran alteradas (51), ensayos *in vitro* han reportado alteración en la producción de citocinas como IL-1 $\beta$  y MCP-1 (52,53). Ante esto, consideramos que sería necesario realizar otro estudio para evaluar la funcionalidad de los monocitos en este grupo de pacientes. Cabe señalar que en un análisis *post hoc* comparamos la frecuencia de monocitos CD3+ entre pacientes con y sin DM y no encontramos diferencia en los valores basales. Durante el seguimiento de los pacientes con TB pulmonar en algunos casos la obtención de la muestra de expectoración estuvo limitada, sin embargo, fue posible en todos los casos tener una evaluación clínica y tuvimos medición de marcadores de respuesta favorable al tratamiento como IL-1 $\beta$  e IP-10.

En conclusión, nuestro trabajo aporta nuevo conocimiento acerca del comportamiento de las subpoblaciones de monocitos CD3+ en pacientes con TB pulmonar, sugiriendo una asociación relevante en la resolución de la infección por M.tb.

### **Perspectivas**

Proponemos evaluar estas subpoblaciones de monocitos CD3+TCR $\alpha\beta$ +/TCR $\alpha\beta$  en un mayor número de pacientes con TB sensible y resistente e incluir otros grupos de pacientes con comorbilidades como VIH, DM2 o uso de fármacos inmunosupresores, para comparar la frecuencia de esta población e identificar alteraciones.

Este trabajo abre una nueva línea para diseñar estrategias experimentales que tengan por objetivo evaluar la función de estas subpoblaciones de monocitos tanto provenientes de sujetos infectados con M.tb como en modelos murino o *in vitro* con la finalidad de identificar el posible rol que jueguen específicamente en el sitio de la infección..

Con respecto a la búsqueda de nuevos biomarcadores para el monitoreo de la enfermedad, nuestros datos mostraron que las formas solubles de los receptores del TNF (sTNFR1 y sTNFR2) podrían ser consideradas, por lo que se propone diseñar un estudio para evaluar el uso de estos marcadores como predictores de respuesta favorable al tratamiento.

#### IV. ANEXOS

**Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados en el estudio.**

| Anticuerpo                             | Fluorocromo          | Clona   | Catálogo | Marca        |
|--|----------------------|---------|----------|--------------|
| CD3                                    | APC/Cy7              | HIT3a   | 300318   | BioLegend    |
| CD3                                    | FITC                 | SK7     | 344804   | BioLegend    |
| CD14                                   | Brilliant Violet 510 | M5E2    | 301842   | BioLegend    |
| CD14                                   | PerCP Cy5.5          | HCD14   | 325622   | BioLegend    |
| HLADR                                  | FITC                 | L243    | 307604   | BioLegend    |
| CD1a                                   | PE/Cy5               | HI149   | 300108   | BioLegend    |
| CD1b                                   | FITC                 | M-T101  | 555969   | BD Pharmigen |
| CD1c                                   | PerCP                | L161    | 331512   | BioLegend    |
| CD1d                                   | PE                   | CD1d42  | 550255   | BD Pharmigen |
| TNFR1/CD120a                           | PE                   | W15099A | 369904   | BioLegend    |
| TNFR2/CD120b                           | PE/Cy7               | 3G7A02  | 358412   | BioLegend    |
| TNF                                    | APC                  | MAb11   | 502912   | BioLegend    |
| TNF                                    | PerCP Cy5.5          | MAb11   | 502926   | BioLegend    |
| TCRab                                  | Brilliant Violet 421 | IP26    | 306722   | BioLegend    |
| Zombie Red<br>Fixable Viability<br>Kit | PE-Texas Red         |         | 423110   | BioLegend    |

**Tabla 2. Kits de ELISA utilizados en el estudio**

| Citocina/quimocina/Receptor       | Catálogo | Lote    | Marca       |
|-----------------------------------|----------|---------|-------------|
| Human IFN $\gamma$ ELISA          | 430104   | B247782 | BioLegend   |
| TNF ELISA Max Deluxe Set          | 430204   | B244798 | BioLegend   |
| IL-1 $\beta$ ELISA Max Deluxe Set | 437004   | B234825 | BioLegend   |
| TNFR1/TNFRSF1A                    | DY225-05 | P144734 | R&D Systems |
| TNFR2/ TNFRSF1B                   | DY726    | P160401 | R&D Systems |
| MCP-1 ELISA Max Deluxe Set        | 438804   | B244167 | BioLegend   |
| IP-10 ELISA Max Deluxe Set        | 4339904  | B245163 | BioLegend   |

**Tabla 3. Características del patrón de resistencia y tratamiento en pacientes con TB farmacorresistente.**

| Caso | Resistencia    | Esquemas de tratamiento        | Duración | Tratamiento finalizado. |
|------|----------------|--------------------------------|----------|-------------------------|
| 1    | H              | Lfx+ RHZE                      | 6 meses  | Curación                |
| 2    | H              | Lfx + RHZE                     | 6 meses  | Curación                |
| 3    | R, H           | Am, Mfx, Pto, Cfz, Lzd, Hh, Z  | 12 meses | Curación                |
| 4    | R              | Am, Mfx, Pto, Cfz, Lzd, Hh, Z  | 12 meses | Curación                |
| 5    | R              | Am, Mfx, Pto, Cfz, Lzd, Hh, Z  | 12 meses | Curación                |
| 6    | R              | Am, Mfx, Lzd, Pto, E, Z        | 24 meses | Continua en tratamiento |
| 7    | R,H, Flq       | Am, Lzd, Cfz, Cs, Pto,Z / Dlm* | 24 meses | Continua en tratamiento |
| 8    | R, H, Z, Eto,S | Am, Mfx, Lzd, Pto, Cfz, E      | 24 meses | Continua en tratamiento |

Todos los pacientes fueron incluidos antes de iniciar tratamiento anti-tuberculosis y se dio seguimiento a los 2 y 6 meses de tratamiento anti-TB. Abreviaturas: R:rifampicina, H: Isoniacida, Z: pirazinamida, E:etambutol, Am: amikacina, Lfx: levofloxacino, Mfx:moxifloxacino, Pto: proteonamida, Cfz: clofazimina, Lzd: linezolid, Cs:cicloserina Hh: altas dosis de isoniacida, Flq: fluoroquinolona, Dlm: delamanid. \*Esquema de tratamiento modificado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Programa Nacional de Becas del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para la formación de nuevos investigadores. CVU 685665

Agradezco infinitamente a mi tutora la Dra. Leslie Chávez Galán por permitir desarrollarme en el campo de la investigación, siendo una guía y un gran ejemplo como científica.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la participación de los pacientes de la Clínica de Tuberculosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Ismael Cosío Villegas.

Agradezco a la Dra. Marcela Muñoz Torrico Jefa de la Clínica de Tuberculosis del INER por el apoyo y enseñanzas durante mis años de formación. Sinceras gracias al apoyo logístico de la Lic.T.S. Angeles Torres y del Lic. Enf. José Alberto Benitez de la Clínica de Tuberculosis del INER.

Gracias a la M. Sc Damaris Romero Rodríguez por su asesoría en la Unidad de Citometría de Flujo del INER.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial Dr. Rogelio Hernández Pando, Dra. Renata Baez Saldaña y a mi jurado de tesis, Dra. Miriam Bobadilla del Valle, Dra. María del Carmen Jiménez Martínez y Dr. Ricardo Lascurrain Ledesma por su valioso tiempo para la revisión de este trabajo.

## XV. BIBLIOGRAFIA

1. Pai M., Behr MA., Dowdy D. et al. (2016) Tuberculosis. Nature Reviews Diseases Primers. DOI:10.1038/nrdp.2016.76
2. Geneva: World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. Consultado fecha 15 de diciembre 2019. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>
3. Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis en las Américas 2018. Consultado fecha 15 de junio 2019. Disponible en [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49510/OPSCDE18036\\_spa?sequence=2&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49510/OPSCDE18036_spa?sequence=2&isAllowed=y)
4. Secretaría de Salud. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Micobacteriosis (Tuberculosis y Lepra). Consultado en fecha 15 de junio 2019. Disponible en: [http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/18\\_Manual\\_Micobacteriosis.pdf](http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/18_Manual_Micobacteriosis.pdf)
5. Hmama, Z., Peña-Díaz, S., Joseph, S., et al. (2015). Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. Immunological Reviews. 264(1), 220–232. DOI:10.1111/imr.12268
6. Kang, PB., Azad, AK., Torrelles, JB., et al. (2005). The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. The Journal of experimental medicine. 202(7), 987–999. DOI:10.1084/jem.20051239
7. Carranza, C. & Chávez-Galán, L. (2019) Several Routes to the Same Destination: Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion by Mycobacterium tuberculosis. The American Journal of the Medical Sciences. 357, 3, p 184-194. DOI: 10.1016/j.amjms.2018.12.003
8. Puissegur, M., Botanch, C., Duteyrat, J. et al. (2004), An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. Cellular Microbiology, 6: 423-433. DOI:10.1111/j.1462-5822.2004.00371.x
9. Cadena, A. M., Fortune, S. M., & Flynn, J. L. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. Nature reviews. Immunology, 17(11), 691–702. DOI:10.1038/nri.2017.69
10. Chávez-Galán, L., Olleros, ML., Vesin, D. & Garcia, I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. Frontiers in Immunology. 6:263. DOI:10.3389/fimmu.2015.00263
11. Xinchun, C., Boping, Z., Meizhong, L. et al. (2007) CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clinical Immunology. 123,1,pp 50-59. DOI: 10.1016/j.clim.2006.11.009.
12. Maglione, PJ., Xu, J. & Chan, J. (2007). B Cells Moderate Inflammatory Progression and Enhance Bacterial Containment upon Pulmonary Challenge with Mycobacterium tuberculosis. The Journal of Immunology. 178(11):7222. DOI: 10.4049/jimmunol.178.11.7222

13. Ling, P.L., Ford, C.B., Coleman, M.T. et al. (2014). Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nature medicine*. 20(1), pp 75–79. DOI:10.1038/nm.3412
14. Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D., & Bethunaickan, R. (2018). Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Frontiers in immunology*, 9, 1726. DOI:10.3389/fimmu.2018.01726
15. Italiani, P. & Boraschi D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*. DOI:10.3389/fimmu.2014.00514
16. Kindht Thomas J, Goldsby Richard A. & Osborne Barbara A. *Inmunología de Kuby*. Mc. Graw Hill. Sexta edición (2007) Cap. 9 pp 223-243.
17. Ngoenkam, J., Schamel, W.W., & Pongchaen, S. (2018). Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor-CD3 complex. *Immunology*. 153(1), 42–50. DOI:10.1111/imm.12809
18. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*. 10, pp 45–65. DOI:10.1038/sj.cdd.4401189
19. Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., et al. (2015). T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 169–200. DOI:10.1146/annurev-immunol-032414-112334
20. Wajant, H., & Beilhack, A. (2019). Targeting Regulatory T Cells by Addressing Tumor Necrosis Factor and Its Receptors in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and Cancer. *Frontiers in immunology*. 10, 2040. DOI:10.3389/fimmu.2019.02040
21. Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20(2), 87–103.
22. Chavez-Galan, L., Vesin, D., Blaser, G., et al. (2017). Transmembrane TNF controls Myeloid-Derived Suppressor Cell activity via TNFR2 and protects from excessive inflammation during BCG-induced pleurisy. *Frontiers in Immunology*. 8:999 DOI: 10.3389/fimmu.2017.00999
23. Chavez-Galan, L., Vesin, D., Segueni, N., et al. (2016). Tumor Necrosis Factor and Its Receptors Are Crucial to Control Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Pleural Infection in a Murine Model. *The American Journal of Pathology*. 186,9, 2364 – 2377. DOI:10.1016/j.ajpath.2016.05.015
24. Dixon, W. G., Hyrich, K. L., Watson, K. D., et al. (2009). Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Annals of the rheumatic diseases*, 69(3), 522–528. DOI:10.1136/ard.2009.118935
25. Beham, A.W., Puellmann, K., Laird, R., et al. (2011). A TNF-Regulated recombinatorial macrophage immune receptor implicated in granuloma formation in tuberculosis. *PLoS Pathogens*. 7(11). DOI: 10.1371/journal.ppat.1002375
26. Fuchs, T., Puellmann, K., Emmert, A. et al. (2015). The macrophage-TCR $\alpha\beta$  is a cholesterol-responsive combinatorial immune receptor and implicated in atherosclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 456,1,59-65. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.034



27. Fuchs, T., Hahn, M., Riabov, V., et al. (2017). A combinatorial  $\alpha\beta$  T cell receptor expressed by macrophages in the tumor microenvironment. *Immunobiology*. 222,1,39-44. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.09.022
28. Chavez-Galan, L., Vesin, D., Blaser, G., et al. (2019). Myeloid cell TNFR1 signaling dependent liver injury and inflammation upon BCG infection. *Scientific Reports*. 9(1):5297. DOI:10.1038/s41598-019-41629-9
29. Rodriguez-Cruz, A., Vesin, D., Ramon-Luing, L., Zuñiga, J., Quesniaux, VFJ., Ryffel B, Lascurain R, Garcia, I. & Chavez-Galan, L. (2019). CD3+ Macrophages Deliver Proinflammatory Cytokines by a CD3- and Transmembrane TNF-Dependent Pathway and Are Increased to the BCG-Infection Site. *Front Immunol*. 2019;10:2550. DOI: 10.3389/fimmu.
30. Zhao, J., Siddiqui, S., Shang, S., Bian, Y., et al. (2015). Mycolic acid-specific T cells protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a humanized transgenic mouse model. *eLife*. 4, e08525. DOI:10.7554/eLife.08525
31. James, CA., Yu, K., Gilleron, M., Prandi, J., et al. (2018). CD1b Tetramers Identify T Cells that Recognize Natural and Synthetic Diacylated Sulfoglycolipids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell chemical biology*. 25(4), 392–402.e14. DOI:10.1016/j.chembiol.2018.01.006
32. Mayer-Barber, KD., Andrade, BB., Oland, SD., et al. (2014). Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*. 511(7507), 99–103. DOI:10.1038/nature13489
33. Chegou, NN., Heyckendorf, J., Walzl, G., et al. (2014). Beyond the IFN- $\gamma$  horizon: biomarkers for immunodiagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*. 43: 1472-1486. DOI:10.1183/09031936.00151413
34. Slight, SR., & Khader, SA. (2013). Chemokines shape the immune responses to tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 24(2), 105–113. DOI:10.1016/j.cytogfr.2012.10.002
35. Ruhwald, M., Aabye, M., & Ravn, P. (2012). IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 12:2, 175-187, DOI: 10.1586/erm.11.97
36. Fuchs, T., Puellmann, K., Dreyfus, D. H., et al. (2019). Immediate Neutrophil-Variable-T Cell Receptor Host Response in Bacterial Meningitis. *Frontiers in neurology*. 10, 307. DOI:10.3389/fneur.2019.00307
37. Segueni, N., Benmerzoug, S., Rose, S., et al. (2016). Innate myeloid cell TNFR1 mediates first line defence against primary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scientific Reports*. 6:22454. DOI: 10.1038/srep22454
38. Roura-Mir, C., Wang, L., Tan-Yun, C., et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* Regulates CD1 Antigen Presentation Pathways through TLR-2. *Journal of Immunology*. 175 (3) 1758-1766. DOI:10.4049/jimmunol.175.3.1758
39. Van Rhijn, I. & Moody, DB. (2015). CD1 and mycobacterial lipids activate human T cells. *Immunological reviews*. 264(1), 138–153. DOI:10.1111/imr.12253

40. Gagliardi, MC., Lemassu, A., Teloni, R., et al. (2007). Cell wall-associated alpha-glucan is instrumental for *Mycobacterium tuberculosis* to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte. *Cellular Microbiology*, 9: 2081-2092. DOI:10.1111/j.1462-5822.2007.00940.x
41. Allie, N., Grivennikov, S. I., Keeton, R., et al. (2013). Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scientific reports*. 3, 1809. DOI:10.1038/srep01809
42. Jayakumar, A., Vittinghoff, E., Segal, MR., et al. (2015). Serum biomarkers of treatment response within a randomized clinical trial for pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 95(4):415–420. DOI: 10.1016/j.tube.2015.04.011
43. Alshevskaya, AA., Kireev, FD., Laushkina, ZA. et al. (2018). Enhanced expression of TNF- $\alpha$ ; type-1 receptors by immune cells in active pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 22(2):212-220. DOI:10.5588/ijtld.17.0404
44. Clifford, V., He, Y., Zufferey, C., et al. (2015). Interferon gamma release assays for monitoring the response to treatment for tuberculosis: A systematic review. *Tuberculosis*. 95, 6:639-650. DOI: 10.1016/j.tube.2015.07.002.
45. Liang, L., Shi, R., Liu, X., Yuan, X., et al. (2017). Interferon-gamma response to the treatment of active pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 21(10), 1145–1149. DOI:10.5588/ijtld.16.0880
46. Anusiem, C. A., & Okonkwo, P. O. (2017). The Impact of Treatment on the Serum Concentration of Interleukin-1 Beta in Pulmonary Tuberculosis. *American Journal of Therapeutics*. 24(3), e329–e332. DOI:10.1097/mjt.0000000000000360
47. Serbina, NV., Jia, T., Hohl, TM. & Pamer EG. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review of Immunology*. 26:421–452. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
48. Hong, JY., Jon Lee, H., Yee Kim, S., et al. (2014). Efficacy of IP-10 as a biomarker for monitoring tuberculosis treatment. *Journal of Infection*. 68,3:252–258. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.09.033
49. Liang, Y., Wang, Y., Li, H., Yang, et al. (2016). Evaluation of a whole-blood chemiluminescent immunoassay of IFN- $\gamma$ , IP-10, and MCP-1 for diagnosis of active pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients. *APMIS*. 124: 856–864. DOI:10.1111/apm.12583.
50. Sigal, GB., Segal, MR., Mathew, A., et al. (2017). Biomarkers of Tuberculosis Severity and Treatment Effect: A Directed Screen of 70 Host Markers in a Randomized Clinical Trial. *EbioMedicine*. 25, 112–121. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.10.018
51. Restrepo, BI. (2016). Diabetes and Tuberculosis. *Microbiology spectrum*, 4(6), 10.1128. DOI:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0023-2016
52. Lachmandas, E., Thiem, K., Van den Heuvel, C., et al. (2018). Patients with type 1 diabetes mellitus have impaired IL-1 $\beta$  production in response to *Mycobacterium*

tuberculosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 37(2), 371–380. DOI:10.1007/s10096-017-3145-y

53. Lopez-Lopez, N., Martinez, A., Garcia-Hernandez, M. H., Hernandez-Pando, R., et al. (2018). Type-2 diabetes alters the basal phenotype of human macrophages and diminishes their capacity to respond, internalize, and control *Mycobacterium tuberculosis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 113(4), e170326. DOI:10.1590/0074-02760170326