



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

**EFFECTO DE LA DIABETES TIPO 2 EN LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T, EL  
PERFIL DE ANTICUERPOS Y EL PERFIL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES  
EN INDIVIDUOS CON TUBERCULOSIS LATENTE O TUBERCULOSIS  
ACTIVA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL:  
**TITULO**

EN:  
**NEUMOLOGIA**

PRESENTA:  
**JAIME RUBÉN MARTÍNEZ SÁNCHEZ**

TUTOR  
**DR. ALEJANDRO HERNÁNDEZ SOLIS**

CD. MX. A 13 DE SEPTIEMBRE DEL 2023



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.

# INDICE

<b>0. Portada</b>	<b>1</b>
<b>1. Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>2. Planteamiento del problema</b>	<b>7</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>8</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>9</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>6. Metodología</b>	<b>11</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>15</b>
<b>8. Análisis de resultados</b>	<b>19</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>20</b>
<b>10. Referencias</b>	<b>21</b>

## 1. Antecedentes

Se estima que 10,6 millones de personas enfermaron de tuberculosis en 2021, en comparación con 10,1 millones en 2020, y 1,6 millones de personas murieron de tuberculosis en 2021 (incluidas 187 000 personas que vivieron con el VIH), en comparación con 1,5 millones en 2020 (incluidas 214 000 personas que viven con el VIH). Además, la tasa de incidencia de tuberculosis aumentó un 3,6% en 2021 en relación con 2020, lo que sugiere una inversión de la tendencia de disminución de casi el 2% por año durante las últimas dos décadas. La carga de la tuberculosis farmacoresistente también aumentó un 3 % entre 2020 y 2021, con 450 000 casos incidentes de tuberculosis resistente a la rifampicina notificados en 2021. Una persona que tiene diabetes tipo 2 tiene 3 veces más probabilidades de desarrollar tuberculosis que los no diabéticos. (1)

La alta susceptibilidad a las infecciones, incluida la tuberculosis, es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes, y la causa probable del aumento de la prevalencia y la complicación de las infecciones en pacientes con DM es la disfunción inmune (2 y 3)

El complejo de Ghon es un hallazgo no patognomónico en radiografía de tórax que es significativo para la tuberculosis pulmonar (PTb). La ubicación del complejo de Ghon suele ser subpleural y predominantemente en la parte superior del lóbulo inferior o en la parte inferior del lóbulo medio o superior. Sin embargo, se puede encontrar en cualquier parte del pulmón. También se debe tener en cuenta que un solo paciente puede tener múltiples complejos de Ghon. El trabajo original describió los hallazgos de la autopsia de pacientes con tuberculosis pulmonar primaria; se observó un solo complejo en 72,4%, y dos complejos en 14,7%; en el otro extremo del espectro, el 3,5% de los pacientes tenían cinco o más complejos de Ghon. (4)

Los granulomas primarios que surgen de los eventos de infección inicial también son morfológicamente distintos de los granulomas postprimarios que se forman a través de la encapsulación de la neumonía caseosa de la propagación broncogénica de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en individuos previamente expuestos a la bacteria. (5)

Después de la infección primaria, *M. tuberculosis* puede progresar de una de tres maneras. La infección primaria puede ser erradicada del cuerpo por el sistema inmunológico. La infección puede persistir en un estado latente y controlado, a veces llamado tuberculosis latente, que puede durar indefinidamente; o, incluso la infección primaria puede pasar por alto la latencia y progresar para causar enfermedad sintomática, a veces denominada tuberculosis activa. (6)

Dada la diversidad de tipos de granulomas y la naturaleza de su ensamblaje, existe una heterogeneidad considerable en la organización de granulomas individuales. En el patrón general en el que las regiones centrales son ricas en macrófagos que algunos han sufrido transición epitelióide, y las poblaciones de linfocitos tienden a estar confinadas a la periferia formando una corona rica en linfocitos rodeando al granuloma. En los bordes se organizan con las células presentadoras de antígeno en folículos linfoides terciarios que permiten la presentación local del antígeno en el sitio de la infección. En granulomas necróticos, las bacterias se encuentran en el núcleo necrótico de granulomas, mientras que escasas bacterias viven intracelularmente dentro de regiones ricas en macrófagos. En granulomas celulares Mtb reside en regiones centrales del granuloma, con ausencia de necrosis evidenciando que Mtb reside intracelularmente, predominantemente en poblaciones de macrófagos que comprenden el núcleo de estos granulomas (7 y 8)

La formación organizada de granulomas disminuye reconocimiento de Mtb. Resultando en reprogramación de macrófagos e inducción de células epitelioides dentro del granuloma, limitando la capacidad para reconocer o migrar a las bacterias dentro de las regiones centrales del granuloma. Los neutrófilos son reclutados preferentemente en las áreas del granuloma deficientes para la transformación epitelial, lo que sugiere que la epitelización limita el reclutamiento de estas células. (9)

La diabetes tipo 2 aumenta el contagio MTb en las vías respiratorias incluso en ausencia de cavitaciones, lo que puede estar relacionado con una mayor carga bacteriana pulmonar y/o una alteración en el microambiente de las vías respiratorias. En hiperglicemia crónica hay elevación de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y carga bacteriana extrapulmonar. Por lo tanto, la gravedad de la enfermedad puede deberse a la expresión alterada de citoquinas particulares y la posterior respuesta inmune celular a la infección por MTb. Los altos niveles de IL-17 e IL-8 en la diabetes con Tb pueden estar relacionados con una mayor infiltración granulocítica y patología, y estos subproductos de la hiperglucemia crónica, combinados con el estrés oxidativo, inducen una respuesta proinflamatoria que contribuye a una inflamación más grave y a la enfermedad de TB con diabetes tipo 2. La infección por M. tuberculosis con un diabético no logra controlar el crecimiento bacteriano debido al aumento de los niveles de citoquinas antiinflamatorias e IL-4 que inhibe la expresión de IFN $\gamma$ , lo que resulta en una rápida progresión de la enfermedad antes del inicio de la inmunidad adaptativa a M. tuberculosis en pacientes diabéticos. (10)

Las moléculas de punto de control inmunitario son receptores inhibitorios expresados en las células inmunitarias que desencadenan vías de señalización inmunosupresora. Estas moléculas son cruciales para mantener la autotolerancia y para modular la longitud y magnitud de las respuestas inmunes efectoras en los tejidos periféricos, con el fin de minimizar el daño tisular colateral. La señalización a través de estas moléculas puede conducir a las células inmunes efectoras (especialmente las células T), a un estado conocido como "agotamiento". El agotamiento de las células T se define por la reducción de la función efectora, la expresión sostenida de moléculas de punto de control inmunitario (como PD-1), respuestas de recuerdo deficientes y un estado transcripcional distinto del de las células T efectoras funcionales o de memoria. Existen numerosos tipos de interacciones activadoras e inhibitorias que ocurren entre las células presentadoras de antígeno (APC) y las células T, y estas regulan la naturaleza de las respuestas inmunes. Ahora está claro que muchos patógenos y cánceres promueven interacciones inhibitorias entre las células inmunes a través de proteínas de punto de control inmune para escapar del control inmune. (11)

La expresión de los marcadores asociados al agotamiento por las células T durante la enfermedad activa es bastante ambigua: a pesar de los éxitos en las terapias contra el cáncer mediante la inhibición de las moléculas del punto de control inmunitario con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1, las terapias experimentales dirigidas a PD1/PDL1 en modelos de TB in vitro e in vivo dieron como resultado un control intracelular deficiente de la infección de Mtb en lugar de una mejor resolución. Lo que sugiere que la PD-1 puede hacer una activación de células T en lugar de un marcador de agotamiento durante la TB. Además, los informes de reactivación de LTBI en pacientes con cáncer tratados con anti-PD-1/PD-L1 justifica una nota de advertencia contra esta terapia en la TB. (12 y 13)

El mecanismo principal de un inhibidor de punto de control inmunitario es eliminar el factor supresor del tumor en la célula tumoral, lo que la expone al sistema inmunitario del huésped. Mejorando la actividad de células T, y destrucción de la célula tumoral. Inicia el reconocimiento

de los receptores de células T a un antígeno en la superficie celular de las células tumorales o las células huésped. Posterior depende del equilibrio entre señales coestimuladoras y coinhibitorias (puntos de control inmunitario) en las células que interactúan. Cuando las señales coestimuladoras abruma a las señales coinhibitorias, se produce la activación de las células T y viceversa. En la vía de muerte programada ligando-1 (PD-L1) / PD-1, cuando PD-1 se involucra con PD-L1, atenúa el receptor de células T y la señalización de CD28 a través del reclutamiento de tirosin fosfatasa, lo que resulta en el agotamiento de las células T. (14)

Se ha identificado que las células dendríticas (DC) que se localizan en las submucosas del tracto respiratorio interactúan directamente con MTB, donde atrapan a los bacilos y los transportan hacia los nódulos linfáticos (32). Diversos receptores de DC pueden interactuar con lipoarabinomano, por ejemplo, DC14 interactúa con un complejo trimolecular que se deriva de LAM con residuos de arabinosa en el extremo terminal (AraLAM), estas moléculas se unirán a su vez al análogo de DC14 de nombre proteína de unión al LPS. El receptor de manosa (MR) constitutivo en macrófagos y DC, va a reconocer fructosa y manosa presente en la superficie de la micobacteria, esta interacción mediará la fagocitosis de MTB en ausencia o presencia de opsoninas (33). Posterior al primer contacto de MTB con CD estas iniciarán el proceso de maduración y diferenciación. Aunque las DC no son el principal blanco de MTB, constituyen un importante papel puesto que, presentan los antígenos microbianos a los linfocitos T, iniciando así una respuesta inmune celular. Se ha logrado identificar que el receptor ICAM-3 (molécula de adhesión intracelular) asociado a CD (DC-SIGN) interactúa con ManLAM de la pared celular de MTB. DEC205 funciona como un PRR con papel importante en el reconocimiento de MTB. La respuesta inmune dependiente de CD frente a la infección por MTB dependerá de la combinación de receptores TLR y DC-SIGN que sean activados, primordialmente (15).

Estudios en humanos y ratones han evidenciado que existe un retraso en la reacción de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4+ frente a MTB, en comparación a un menor tiempo de respuesta frente a otros patógenos. Entre 7 y 11 días posteriores a la exposición de MTB, se origina la activación de las células T CD4+. En ratones la demora se debe a un intervalo de tiempo entre la infección primaria y la migración de CD infectadas con MTB de los pulmones a los ganglios linfáticos, donde la micobacteria será reconocida por células T. Esto conlleva a una diseminación de la micobacteria, dándole ventaja (16).

Los linfocitos T CD4+ van a reconocer antígenos presentados por moléculas MHC/HLA de clase II, produciendo IFN- $\gamma$  y provocando una activación de los MA. Diferentes clases de células T CD4+ van a participar en inmunidad frente a MTB, la más estudiada son las células Th1, para su mantenimiento y desarrollo requieren de IL-12 y T-bet, secretan IFN- $\gamma$ , aunque en algunas ocasiones también puede producir TNF e IL-2. Las células Th17 en ratones aumentan la respuesta inmune frente a una vacuna con BCG, y también son importantes ya que participan en la formación del granuloma maduro (17).

La citocina IL-17 producida por este tipo de células está involucrada en la respuesta inflamatoria frente a patógenos como MTB. Las células T reguladoras (Tregs) se encuentran en cantidad elevada en pacientes con TBA, siendo mayor su frecuencia en zonas tisulares en tuberculosis miliar y pleural. Estas células dependen del factor de crecimiento transformante de citocinas  $\beta$  y de FoxP3. Su papel frente a la infección de tuberculosis se evidencia en un estudio en ratones donde se observó que aquellos ratones que desarrollaban tuberculosis latente contaban con niveles altos de células Treg en sangre periférica, previo a ser infectadas con la micobacteria; en comparación con ratones que desarrollaron tuberculosis activa estos contaban con un bajo nivel

de células Treg antes de la inoculación con MTB. También se visualizó que la presencia de moléculas como CD279 y CD152 denotan un agotamiento de Tregs resultando en una reducción de la carga bacteriana en pulmones (18).

Las células T de memoria y efectoras se pueden clasificar con el uso de técnicas que detectan marcadores de superficie, como moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas. Los linfocitos T de memoria se pueden dividir en CD62L+ o CD62L-. Las células CCR7+ CD45RA- se denominan linfocitos T de memoria central (TCM) y se pueden encontrar en tejido linfóide secundario, aquellas que son CCR7- CD45RA- se les conoce como células de memoria efectora (TEM) se suelen alojar en tejidos periféricos y finalmente aquellas CCR7- CD45RA+ se les conoce como células T efectoras (TE). Estudios en macacos y humanos han llevado a la identificación de células T con características similares a las células madre y las llamaron células madre T de memoria (TSCM), continuaron investigando a esta población y descubrieron la existencia de otro tipo de célula T los cuales nombraron linfocitos T naïve (TN) que son CCR7+ CD45RA-, cuentan con sobreexpresión de CD95, expresión superficial de CD62L, y ausencia de marcadores de activación celular como CD25, CD44 y CD69. La estimulación antigénica continua causa una pérdida gradual de la capacidad de memoria y de la producción de citocinas. En diferentes estudios se ha evaluado la presencia o ausencia de los subtipos celulares del tipo T en respuesta a agentes como el VIH, virus de la hepatitis C (VHC) y en MTB, donde se observó que las células TEM se multiplican ante el estímulo de IL-7 e IL-5, inversamente TCM prolifera y se transforma en TEM ante la ausencia de estas citocinas (19).

EL IFN- $\gamma$  es una citocina que se detecta con mayor relevancia ante una infección de MTB, las personas con TBA presentan mayores niveles de esta citocina en el líquido de lavado bronco alveolar (BAL) y va disminuyendo frente a un tratamiento exitoso. La disminución de IFN- $\gamma$  por parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se asocia a una patología de TB más grave, esto se puede deber a que las PBMCs de personas con TBA tienen una incidencia mayor a la apoptosis que las personas sanas y esto conllevaría a una menor cantidad de células capaces de producir IFN- $\gamma$ . Por otro lado, la disminución del interferón nos puede indicar que las células T efectoras son las que están actuando contra MTB. IFN- $\gamma$  actúa en la maduración del endosoma, induce la producción de péptidos antimicrobianos y también LGR-47, proteína que ayuda a la sobrevivencia de los linfocitos T efectores y los protege de la acción apoptótica inducida por IFN (20 y 21).

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento contra el cáncer diseñado para estimular la respuesta inmunitaria natural del cuerpo para combatir el cáncer. Donde los anticuerpos pueden bloquear las interacciones inmunosupresoras entre las células presentadoras de antígenos o las células cancerosas con células T, para mejorar las respuestas inmunitarias. El bloqueo por anticuerpos restablece las funciones de las células T. Los dos mejores ejemplos son el bloqueo de PD-1 y CTLA4, que se expresan en las células T efectoras y median el agotamiento cuando están en contacto con sus ligandos, PD-L1 y CD80 / CD86 respectivamente. Si bien el desarrollo de la inmunoterapia se ha restringido al tratamiento del cáncer, existe un gran interés en el papel de estos anticuerpos para las enfermedades infecciosas. (22)

## **2. Planteamiento del problema:**

Hay evidencia escasa en el comportamiento de la respuesta inmune celular en pacientes con hiperglicemia continua, ya que este estado mantiene un agotamiento celular de CD4+, manifestando una disminución de la respuesta inmune ante infecciones crónicas. Esto conlleva a estudiar las alteraciones condicionadas por la diabetes tipo 2 descontrolada, ya que en estos pacientes la respuesta inmune tiende a responder de manera poco eficiente por disminución en población de linfocitos y con esto se mantiene una cascada de señalización deficiente para limitar el crecimiento de las micobacterias y otros microorganismos.

Además, pacientes en estado de tuberculosis latente, al disminuir en este caso por diabetes tipo 2, se reactiva la micobacteria (en general el material biológico que se encuentre dentro del granuloma) ya que la cascada que mantenía el granuloma “quiescente”, se altera y permite que se reproduzca de manera exponencial la micobacteria causando infección postprimaria. Esta respuesta inmune disminuida se favorece en pacientes con inflamación crónica condicionando estados de agotamiento celular de los linfocitos T CD4+.

### **3. Justificación:**

El proyecto se enfoca en medir la carga de expresión de la molécula de agotamiento y muerte celular PD1 y su interacción con el ligando PDL1 y PDL2 en pacientes con diabetes y en un grupo control sin diabetes. Así como en familiares directos en contacto al paciente con tuberculosis. Por lo tanto, se observó el comportamiento de esta molécula en pacientes con y sin diabetes, así como la correlación con la severidad de la tuberculosis y su afectación multisistémica.

#### **4. Hipótesis:**

Comportamiento de la molécula de agotamiento celular PD1 celular de linfocitos T en personas con diabetes tipo 2 y grupo control sin diabetes, con tuberculosis activa o tuberculosis latente en hospital de tercer nivel.

Dado el comportamiento de la gravedad de la infección por tuberculosis en los pacientes con algún tipo de inmunocompromiso, se espera encontrar relevancia en la carga de moléculas PD-1/PDL-1 en pacientes diabéticos y comparativamente disminuida en los pacientes sin diabetes tipo 2 o alguna enfermedad en relación con carbohidratos, ya que al conocer los factores que aumentan esta unión de receptor – ligando podemos deducir que ante más grave sea la infección, mayor riesgo de progresión de enfermedad e incluso de morbimortalidad.

En los pacientes con infección de tuberculosis y que no tengan alguna alteración con los carbohidratos, se espera una mejor respuesta para el tratamiento antituberculoso, con mayor tolerancia a cambios intersticiales pulmonares, menores síntomas de gravedad y menor riesgo de requerir ventilación mecánica invasiva.

Así como en los pacientes con tuberculosis latente, se espera encontrar una carga baja de moléculas PD1/PDL1 o PDL2, para que pueda mantener la capacidad de continuar en modo latente el granuloma para no poder manifestar una enfermedad activa hasta que la inmunidad se encuentre comprometida.

## 5. **Objetivos:**

### a. General:

Relacionar niveles de molécula PD1 de los linfocitos T en pacientes con diabetes tipo 2 e infección activa de tuberculosis asociada a su gravedad de cuadro clínico.

### b. Específicos:

Relacionar niveles de moléculas PD1 de linfocitos T en tuberculosis latente de familiares directos de pacientes con tuberculosis activa.

Comparar niveles de moléculas PD1 de linfocitos T en pacientes con tuberculosis activa y tuberculosis latente.

Evidenciar comportamiento de molécula de agotamiento celular de linfocitos T en la población mexicana con tuberculosis activa y portadores de diabetes tipo 2.

## 6. Metodología:

### a. Tipo y diseño del estudio

Prospectivo, comparativo, longitudinal y analítico.

### b. Población y tamaño de la muestra

Los individuos que participarán en este estudio se reclutaron de la Clínica de Detección Temprana de Diabetes, en el servicio de Medicina Interna, y en el servicio de Neumología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" de la Secretaría de Salud. El proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación de dicho Hospital (clave de registro DI/21/503/05/21). Se incluyeron a individuos que cumplieron con los criterios de selección durante el periodo del estudio.

### c. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

#### i. Criterios de inclusión:

Se seleccionaron individuos con criterios de inclusión de cada uno de los grupos de estudio; se les invito a participar en el estudio plasmando autorización al firmar una carta de consentimiento informado.

**Grupo 1** (Individuos con TB activa sin diabetes tipo 2): Se incluyeron individuos entre 20 y 65 años diagnosticados en su primer episodio de TB pulmonar activa, según estudios radiológicos y microbiológicos (tinción de Ziehl-Neelsen, cultivo y prueba de GeneXpert MTB/RIF) en el servicio de Neumología. Se incluyeron individuos en los cuales la prueba de GeneXpert MTB/RIF indico que están infectados con una cepa de M. tuberculosis sensible a rifampicina, lo que sugiere que el individuo responderá satisfactoriamente al tratamiento de primera línea.

**Grupo 2** (Individuos con diabetes tipo 2 y TB activa): Se incluirán individuos entre 20 y 65 años que presenten diabetes tipo 2 según los criterios de la ADA indicados arriba, que además sean diagnosticados en su primer episodio de TB pulmonar activa, según estudios radiológicos y microbiológicos, en el servicio de Neumología. Se incluirán individuos en los cuales la prueba de GeneXpert MTB/RIF indique que están infectados con una cepa de MTB sensible a rifampicina, lo que sugiere que el individuo responderá satisfactoriamente al tratamiento con antibióticos de primera línea.

#### ii. Criterios de exclusión:

No se incluyeron en este estudio a personas embarazadas, a individuos que estén en tratamiento con inmunosupresores o que sean portadores del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), a individuos con alergia, con cáncer o con alguna patología autoinmune subyacente, o a individuos que hayan tenido una cirugía mayor en los últimos tres meses.

#### iii. Criterios de eliminación:

Se eliminaron de este estudio a los individuos con diagnóstico de TB pulmonar activa en los cuales la prueba de GeneXpert MTB/RIF indique que están infectados con una cepa de MTB resistente a rifampicina. También se eliminaron a los individuos cuyas muestras de sangre no sean óptimas para su procesamiento, y a aquellos individuos que retiren su consentimiento informado.

#### **d. Variables a evaluar y forma de medirlas**

##### **i. Análisis de la respuesta de linfocitos T**

La participación en este proyecto de investigación implicó la donación de una muestra de 24 ml de sangre periférica en una sola ocasión. La sangre se obtuvo mediante punción percutánea con un sistema Vacutainer estéril y desechable; la cantidad de sangre extraída no representó ningún riesgo para el individuo. En cada toma de muestra se obtuvieron 2 tubos con heparina de litio equivalente a 12 ml de sangre periférica, para prueba de QuantiFERON. Se dio seguimiento a todos los participantes hasta que concluyó el estudio, para determinar si alguien de los individuos de los grupos 1, 2, 4 y 5 desarrolló TB activa.

Todos los individuos que participaron en el estudio se les realizó prueba de Quantiferón. Esta prueba contiene cuatro tubos: 1) Control Negativo; 2) Control Positivo; 3) Tubo con los antígenos de MTB ESAT-6 (esxA, Rv3875) y CFP10 (esxB, Rv3874) (que activan principalmente linfocitos T CD4); 4) Tubo con ESAT-6, CFP10, y otros antígenos de MTB que activan principalmente linfocitos T CD8. A cada tubo se le adiciona 1 ml de sangre anticoagulada con heparina de litio, y se incubó durante 24 h. Se toman alícuotas de 50 µl de la sangre para analizarlas por citometría de flujo; los linfocitos T CD4 y T CD8 se clasifican en las siguientes subpoblaciones: naïve (TN, CD45RA+ CCR7+), de memoria central (TCM, CD45RA-CCR7+), de memoria efectora (TEM, CD45RA- CCR7-) y efectoras (TE: CD45RA+ CCR7-). En cada una de estas subpoblaciones se midió la expresión de CD279 (PD-1), CD152 (CTLA-4), CD25 (cadena alfa del receptor de interleucina 2), CD62L (L-selectina), CD69 (marcador de activación temprana), CD95 (receptor de muerte FAS), CD127 (subunidad alfa del receptor de interleucina 7) y Ki67 (marcador de proliferación celular).

##### **ii. Inmunoproliferación de las diferentes poblaciones de linfocitos T.**

Se colocó 50 µL de sangre periférica en tubos de poliestireno y se adicionó un volumen previamente titulado de los anticuerpos para la Inmunofenotipificación (CD3, CD4, CD8, CCR7 y CD45RA) y moléculas de interés (PD-1, CTLA-4, CD95, CD25, CD69, CD62L, CD127 y Ki67), se incubó durante 15 minutos a 4 °C, en oscuridad. Al término de la incubación se agregó a cada tubo 1 mL de solución de lisis de eritrocitos y se realizó una segunda incubación durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Se realizó un lavado agregando 1 mL de PBS 1x, se homogenizó y centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, decantando el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado bajo las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 µL de paraformaldehído al 1% y se almacenaron a 4°C, protegiendo de la luz hasta su adquisición en el citómetro en un periodo no mayor a 72 horas. Las muestras se adquirieron en el citómetro FACS Aria III de la central analítica de la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos (UDIBI) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa FlowJo. Los anticuerpos empleados se adquirieron en BioLegend y ThermoFisher conforme a los paneles diseñados (Tabla 2). Para la selección de los fluorocromos se utilizó el programa en línea Flow Cytometry Panel Builder de ThermoFisher, introduciendo los parámetros del citómetro de la UDIBI, los fluorocromos más brillantes se asignaron a las marcas de interés que presentan una menor densidad antigénica. Sin embargo, también se consideró la existencia de los anticuerpos con el fluorocromo de interés, de manera inversa se asignaron fluorocromos de media a baja brillantez a moléculas de membrana que tienen una mayor

densidad antigénica. Se utilizaron controles de isotipo para los marcadores CD62L, CD127 y Ki68 (PE/Cyanine7 Mouse IgG1,  $\kappa$  Isotype Ctrl), para las marcas PD-1, CTLA-4 y CD95

**Tabla 2. Diseño de los paneles a utilizar.**

Fluorocromos	Panel 1	Panel 2	Panel 3	Panel 4	Panel 5	Panel 6
1 PE-Dazzle 594	CD3	CD3	CD3	CD3	CD3	CD3
2 PE	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
3 Alexa Fluor 488	CD45RA	CD45RA	CD45RA	CD45RA	CD45RA	CD45RA
4 APC	CCR7	CCR7	CCR7	CCR7	CCR7	CCR7
5 APC-fire 750	PD-1	PD-1	CD25	CD25	CD25	CD25
6 PE-Cy7	CTLA-4	CTLA-4			CD62L, CD127, Ki67	CD62L, CD127, Ki67
7 PerCP-eFluor 710	CD95	CD95	CD69	CD69	CD69	CD69

se utilizaron controles de fluorescencia menos uno (FMO), tanto para linfocitos T CD4+ como CD8+. Las clonas que se emplearon son las siguientes, CD3 (HIT3a), CD4 (OKT4), CD8, (SK1), CD45RA (HI100), CCR7 (G043H7), PD-1 (EH12.2H7), CTLA-4 (L3D10), CD95 (DX2), CD25 (M-A251), CD69 (FN50), CD62L (DREG-56), CD127 (A019D5) y Ki67 (Ki-67).

### iii. Titulación de anticuerpos

Se realizó una extracción de 20 ml de sangre periférica mediante venopunción con sistema de vacío BD Vacutainer®. Posteriormente se realizó la extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante gradiente de densidad usando una relación 1:2 de ficol y sangre periférica. Se adiciono 4ml de ficol a un tubo cónico y en seguida se adicionaron 8ml de sangre periférica deslizándola por las paredes lentamente. Se centrifugó a 1500 RPM durante 35 minutos. Se extrajo el halo de células mononucleares y se adiciono 7 ml de PBS, posteriormente se llevó a centrifugar nuevamente a 1500 RPM durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio AIM-V®. Se llevó a cabo el conteo y viabilidad de mononucleares mediante la tinción de exclusión con azul tripano, se colocaron 1.5 millones de células por pozo en placa de 24 pozos (Corning™ Costar™) en un volumen final de 1.5 mL de medio AIM-V. A cada pozo se le adicionó 30  $\mu$ L de fitohemaglutinina (PHA al 3%) y se dejó incubando durante un periodo de 48 horas. Finalmente se realizó una tinción de membrana con 4 volúmenes distintos del anticuerpo, 0.5, 1, 2 y 3  $\mu$ L, los tubos se adquirieron en el citómetro de la UDIBI y en el citómetro BD FACSAriaFusion II de la Escuela Superior de Medicina. Para las marcas CD3, CD4, CD8 y CD45RA se realizó la titulación de anticuerpos a partir de una tinción de membrana con una muestra de sangre periférica total, siguiendo los pasos del apartado anterior.

**Tabla 3. Titulación de anticuerpos.**

Anticuerpo	Volumen titulado
CD3-PE-Dazzle 594 clona HIT3a	0.1 µg/µL
CD8-PE clona 35B	0.2 µg/µL
CD4-PE clona OKT4	0.2 µg/µL
CD45RA-Alexa Flúor 488 clona HI100	0.4 µg/µL
CCR7-APC clona 3D12	0.75 µg/µL
PD-1-APC-Alexa Flúor 750 clona EH12.2H7	0.4 µg/µL
CTLA-4-PE-C7 clona 14D3	0.3 µg/µL
FAS-PerCP-eFlúor 710 clona DX2	0.3 µg/µL
CD25-APC-Alexa Flúor 750 clona M-A251	0.4 µg/µL
CD69-PerCP-eFluor 710 clona FN50	0.75 µg/µL
CD62L-PE-C7 DREG56	0.3 µg/µL
CD127-PE-C7 clona eBioRDR5	0.3 µg/µL
Ki67-PE-C7 clona SoIA15	0.4 µg/µL

Se muestra la concentración que se eligió para cada uno de los anticuerpos.

## 7. Resultados

Este documento es un brazo correspondiente al protocolo previamente descrito. El cual está basado en analizar la expresión de múltiples proteínas y receptores para la supervivencia de las poblaciones de linfocitos en diferentes panoramas.

Del cual, para la elaboración de esta tesis nos centraremos en la proteína de muerte celular en linfocitos T con nombre PD-1, así como el receptor para el Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos con acrónimo CTLA-4.

De lo planeado, de los meses de mayo del 2023 a julio 2023 se obtuvieron muestras previo consentimiento de 13 personas, de las cuales, se ordenaron en dos grupos, el primer grupo de 10 personas con tuberculosis ya sea pulmonar, pleural o en otros sitios; el segundo grupo de 3 personas con antecedente o recién diagnóstico de Diabetes tipo 2, con diagnóstico de tuberculosis pulmonar 2 casos y un caso de tuberculosis pleural.

Cabe destacar que de todos estos pacientes se obtuvo una muestra al encontrarse hospitalizados en piso de neumología adultos en durante los primeros días del diagnóstico y el inicio de la terapia dirigida con Dotbal®. Se resumen información de cada paciente en las siguientes 2 tablas.

<i>Grupo 1</i>	<i>Sitio de infección</i>	<i>de Ferritina ng/mL</i>	<i>Linfocitos absolutos</i>	<i>Toxicomanías</i>
<i>Persona 1</i>	Pulmonar y pleural	2,578	800	Alcoholismo y tabaquismo
<i>Persona 2 *</i>	Pleural	879	2,300	Alcoholismo y tabaquismo
<i>Persona 3 *</i>	Pulmonar	1,123	2,280	Ninguna
<i>Persona 4</i>	Pulmonar, medula ósea y riñón	18,454	200	Ninguna
<i>Persona 5</i>	Pleural	577	920	Ninguna
<i>Persona 6</i>	Pulmonar	1,069	660	Alcoholismo e inhalantes
<i>Persona 7</i>	Pulmonar y ósea	4,341	940	Alcoholismo y tabaquismo
<i>Persona 8</i>	Pulmonar	832	660	Ninguna
<i>Persona 9</i>	Pulmonar			Tabaquismo
<i>Persona 10</i>	Pulmonar y ósea	9,872	460	Ninguna

Tabla 1. Tuberculosis ATS 3 sin diabetes tipo 2

\* Pacientes con diagnóstico de prediabetes por hemoglobina glucosilada en 5.8 y 6.2% respectivamente.

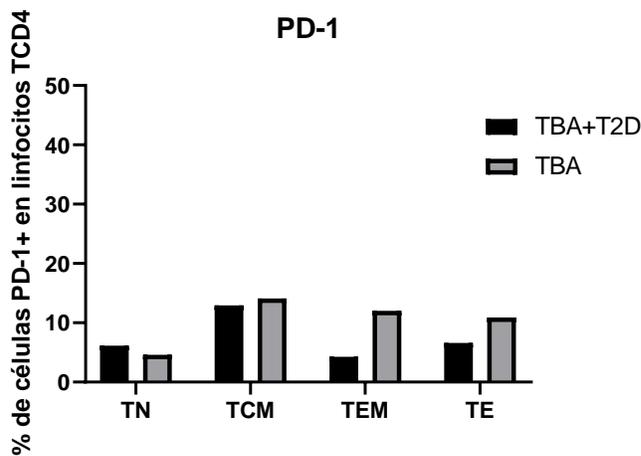
De estas 10 personas, 9 se encuentran evolucionando de manera favorable cumpliendo fase intensiva en su segundo y tercer mes indicado por severidad de cuadro clínico y extensión de infección, sin embargo, una de ellas falleció en Unidad de Cuidados Intensivos por choque séptico de foco pulmonar sin aislamiento de otros patógenos.

Grupo 2	Sitio de infección	Ferritina ng/mL	Linfocitos absolutos	Toxicomanías
Persona 11	Pleural	135	1,100	Tabaquismo
Persona 12	Pulmonar	1548	610	Alcoholismo
Persona 13	Pulmonar	359	940	Alcoholismo y tabaquismo

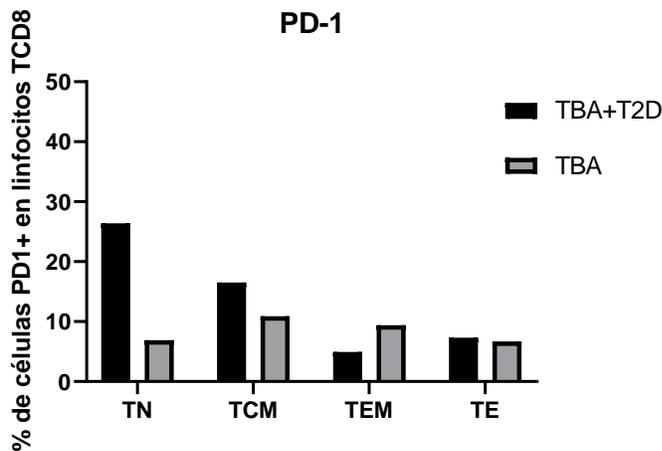
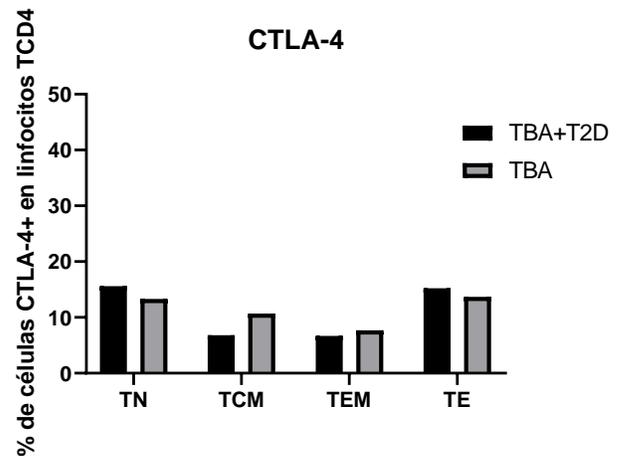
Tabla 2. Tuberculosis ATS 3 con diabetes tipo 2

Se decidió agrupar de esta manera para poder comparar el efecto de esta enfermedad con relación en la respuesta inmunológica hacia la tuberculosis.

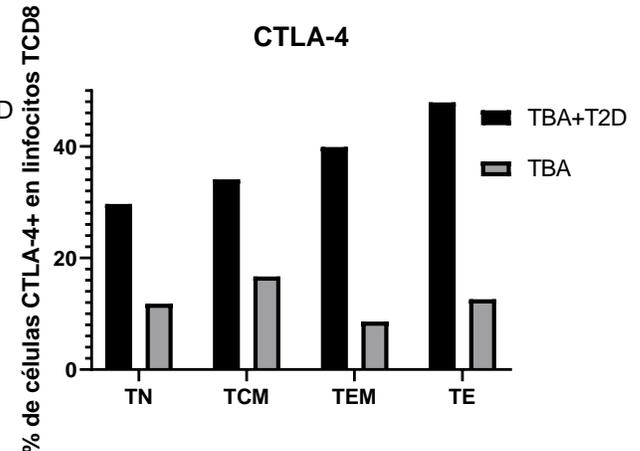
Posterior a la toma de muestra, se analizaron por citometría de flujo separando las poblaciones de linfocitos T en CD4+ y CD8+ y obtuvieron los siguientes resultados:



Porcentaje de eventos CD4+ en región positiva



Porcentaje de eventos CD8+ en región positiva



Dentro de toda la población de pacientes con infecciones por tuberculosis que se tratan en nuestro servicio de Neumología, se obtuvo una muestra de 13 pacientes con tuberculosis con diferentes grados de enfermedad en diversos órganos, ya que es bien conocido que esta infección no solo es a nivel pulmonar.

Desafortunadamente, hasta el momento de la investigación no se encontró bibliografía con valores de referencia para la expresión del marcador de muerte celular (PD1) de linfocitos T, sin embargo, la investigación se centro en el porcentaje de expresión de este marcador en ambos grupos de población de linfocitos T de pacientes con tuberculosis activa y diabetes tipo 2 y únicamente pacientes con tuberculosis activa.

Los linfocitos T CD4 y CD8+ se separaron en 4 grupos acorde a la expresión de sus "Cluster de Differentiation" de la siguiente manera:

1. TN: Linfocitos T Naive
2. TCM: linfocitos T de memoria central
3. TEM: linfocitos T de memoria efectora
4. TE: linfocitos T efectores

De la población de linfocitos T CD4+ Naive, se encontró una expresión de PD1 de 5% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 7% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ Naive, se encontró una expresión de PD1 de 8% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 26% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD4+ TCM, se encontró una expresión de PD1 de 16% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 14% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ TCM, se encontró una expresión de PD1 de 12% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 18% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD4+ TEM, se encontró una expresión de PD1 de 14% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 4% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ TEM, se encontró una expresión de PD1 de 4% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 16% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD4+ TE, se encontró una expresión de PD1 de 11% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 6% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ TE, se encontró una expresión de PD1 de 6% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 8% de PD1 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD4+ Naive, se encontró una expresión de CTLA4 de 12% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 15% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ Naive, se encontró una expresión de CTLA4 de 8% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 26% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD4+ TCM, se encontró una expresión de CTLA4 de 11% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 7% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ TCM, se encontró una expresión de CTLA4 de 16% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 36% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD4+ TEM, se encontró una expresión de CTLA4 de 8% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 7% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ TEM, se encontró una expresión de CTLA4 de 8% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 39% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD4+ TE, se encontró una expresión de CTLA4 de 13% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 15% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

De la población de linfocitos T CD8+ TE, se encontró una expresión de CTLA4 de 11% en pacientes con tuberculosis activa sin diabetes tipo 2, mientras que expresaron un 48% de CTLA4 los pacientes con diabetes tipo 2.

## 8. Análisis de resultados

De todo lo descrito en los resultados, lo más destacable es la gran diferencia de expresión de CTLA4 en la población de linfocitos T CD8+ en población con diabetes tipo 2 en las 4 subpoblaciones de linfocitos T, con nada despreciable pequeño aumento de PD1 en las poblaciones de linfocitos T CD4+ Naive y de memoria central, lo que explica la respuesta deficiente de los linfocitos T citotóxicos y cooperadores ante una inflamación crónica como lo es la enfermedad por tuberculosis.

Dado el grado de afectación de la infección, es proporcional con los valores de linfopenia al inicio del abordaje diagnóstico, se correlaciono con los títulos de expresión de receptores CTLA4 más elevados lo que justifica el hallazgo de linfopenia en estos pacientes, sin importar si tienen diabetes o no.

Otro valor de laboratorio que hay que tomar en consideración es la ferritina sérica, ya que si bien sabemos, es un marcador de inflamación, en pacientes con inflamación crónica se puede permanecer en valores normales o en valores elevados, depende el grado de afectación en que se encuentre, desafortunadamente en esta investigación la paciente con el valor e ferritina con mayor elevación tuvo un desenlace fatal.

Es importante destacar que en la búsqueda de valores de corte para la expresión de PD1 y CTLA4 no se encontró valor de referencia para ninguna población de linfocitos. Por lo que es imprescindible el realizar más investigación para obtener referencia en la expresión de estos receptores.

## 9. Conclusiones

La investigación que hay para los marcadores de agotamiento celular en linfocitos está prácticamente encaminada a pacientes con cáncer, necesitamos más estudios prospectivos que evidencien el comportamiento de estos marcadores de agotamiento en diferentes enfermedades crónicas como lo es la infección por tuberculosis.

Con los resultados de este protocolo podemos concluir que la expresión de CTLA4 en linfocitos T CD8+ al encontrarse mas elevado, es un marcador de peor pronostico ya que no asegura la respuesta correcta de las poblaciones de linfocitos T, por lo que el paciente no tendrá una respuesta inmunológica adecuada para limitar el crecimiento del bacilo acido alcohol resistente.

Además, falta la evidencia de como se encuentra la expresión de estos marcadores en pacientes con tuberculosis activa que no tienen criterios de hospitalización, se puede pensar que estaría baja la expresión de estos, sin embargo, falta investigación para confirmar está teoría.

Además, el presentar un aumento en la expresión de los marcadores de agotamiento celular, no solo es por inflamación por infección de tuberculosis; la misma diabetes tipo 2 aumenta expresión de PD1 y CTLA4, lo que traduce una mayor susceptibilidad para no limitar el crecimiento de la micobacteria y así desarrollar la enfermedad y además, desarrollar una expresión de gravedad de la misma.

De los pacientes que tuvieron tuberculosis sin diabetes tipo 2, en su mayoría fueron jóvenes, sin comorbilidades al momento del diagnóstico de la infección por tuberculosis, sin embargo, el no tener una comorbilidad no limita el desarrollo de una expresión de gravedad de la misma infección, ya que de los 10 pacientes sin diabetes, todos cumplieron con criterios de hospitalización. El criterio que se encontró como detonante de gravedad de la infección fue la alteración en el peso, ya que 3 de estos pacientes tuvieron IMC < 18 kg/m<sup>2</sup> y 7 tuvieron IMC > 25 kg/m<sup>2</sup>, además que 6 pacientes tuvieron antecedente de ser fumadores o consumir drogas inhaladas y los otros 4 no tuvieron este factor.

## 10. Referencias:

- (1) Bagcchi, S. (2023). WHO's Global Tuberculosis Report 2022. *The Lancet Microbe*, 4(1), e20. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(22)00359-7)
- (2) Geerlings, S. E., & Hoepelman, A. I. M. (1999). Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26(3-4), 259-265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1999.tb01397.x>
- (3) Martens, G. W., Arikan, M., Lee, J., Ren, F., Greiner, D. L., & Kornfeld, H. (2007). Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37(5), 518-524. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0478oc>
- (4) Biblioteca digital - acceso remoto. (s. f.). <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/books/NBK551706/>
- (5) Stephenson, L., & Byard, R. W. (2019). An atlas overview of characteristic features of tuberculosis that may be encountered at autopsy. *Forensic Science Medicine and Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s12024-019-00161-y>
- (6) Stephenson, L., & Byard, R. W. (2020). An atlas overview of characteristic features of tuberculosis that may be encountered at autopsy. *Forensic science, medicine, and pathology*, 16(1), 143–151. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s12024-019-00161-y>
- (7) Dyck, L., & Mills, K. H. G. (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European Journal of Immunology*, 47(5), 765-779. <https://doi.org/10.1002/eji.201646875>
- (8) Kauffman, K. D., Sallin, M., Sakai, S., Kamenyeva, O., Kabat, J., Weiner, D. M., Sutphin, M., Schimel, D., Via, L. E., Barry, C. E., Wilder-Kofie, T., Moore, I. N., Moore, R., & Barber, D. L. (2017). Defective positioning in granulomas but not lung-homing limits CD4 T-cell interactions with Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages in rhesus macaques. *Mucosal Immunology*, 11(2), 462-473. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.60>
- (9) Cronan, M. R., Beerman, R. W., Rosenberg, A. F., Saelens, J. W., Johnson, M. G., Oehlers, S. H., Sisk, D. M., Smith, K. L. J., Medvitz, N. A., Miller, S., Trinh, L. A., Fraser, S. E., Madden, J. F., Turner, J., Stout, J. E., Lee, S., & Tobin, D. M. (2016b). Macrophage epithelial reprogramming underlies mycobacterial granuloma formation and promotes infection. *Immunity*, 45(4), 861-876. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.014>
- (10) Ayelign, B., Negash, M., Genetu, M., Wondmagegn, T., & Shibabaw, T. (2019b). Immunological impacts of diabetes on the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology research*, 2019, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/6196532>
- (11) Wykes, M. N., & Lewin, S. R. (2017). Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 91-104. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.112>
- (12) Lee, M., Huang, Y., Kuo, Y., Luo, C., Shih, Y., Shu, C., Wang, J., Ko, J., Yu, C., & Lin, H. H. (2016b). Diabetes Mellitus and Latent tuberculosis Infection: A Systemic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, ciw836. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw836>
- (13) Kiliñç, G., Saris, A., Ottenhoff, T. H. M., & Haks, M. C. (2021b). Host-directed therapy to combat mycobacterial infections\*. *Immunological Reviews*, 301(1), 62-83. <https://doi.org/10.1111/imr.12951>
- (14) Khan, N., Vidyarthi, A., Amir, M., Mushtaq, K., & Agrewala, J. N. (2016). T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(2), 133-141. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2016.1185603>

- (15) Vogel A, Martin K, Soukup K, Halfmann A, Kerndl M, Brunner JS, et al. JAK1 signaling in dendritic cells promotes peripheral tolerance in autoimmunity through PD-L1-mediated regulatory T cell induction. *Cell Rep* [Internet]. 2022;38(8):110420. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110420>
- (16) Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med* [Internet]. 2008;205(1):105–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20071367>
- (17) Lu Y-J, Barreira-Silva P, Boyce S, Powers J, Cavallo K, Behar SM. CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell Rep* [Internet]. 2021;36(11):109696. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109696>
- (18) Tonaco MM, Moreira JD, Nunes FFC, Loures CMG, Souza LR, Martins JM, et al. Evaluation of profile and functionality of memory T cells in pulmonary tuberculosis. *Immunol Lett* [Internet]. 2017;192:52–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.10.014>
- (19) Mpande CAM, Steigler P, Lloyd T, Rozot V, Mosito B, Schreuder C, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell functional, memory, and activation profiles in QuantiFERON-reverters are consistent with controlled infection. *Front Immunol* [Internet]. 2021;12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.712480>
- (20) Yerrapragada R M, Mampallil D. Interferon- $\gamma$  detection in point of care diagnostics: Short review. *Talanta* [Internet]. 2022;245(123428):123428. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123428>
- (21) Švajger U, Tešić N, Rožman P. Programmed death ligand 1 (PD-L1) plays a vital part in DC tolerogenicity induced by IFN- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2021;99(107978):107978. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107978>
- (22) Kauffman KD, Sakai S, Lora NE, Namasivayam S, Baker PJ, Kamenyeva O, et al. PD-1 blockade exacerbates *Mycobacterium tuberculosis* infection in rhesus macaques. *Sci Immunol* [Internet]. 2021;6(55). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.abf3861>