

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Identificación de proteínas y RNA de *Mycobacterium tuberculosis* en exosomas de MDM infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv y en exosomas de suero de pacientes con tuberculosis pulmonar multifarmacorresistente.**

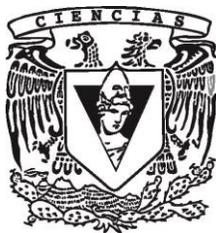
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JESSICA YURERI SÁNCHEZ GODÍNEZ**



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

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS  
“ISMAEL COLOSIO VILLEGAS”  
CDMX, 2023**



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.

## Hoja de datos del jurado

### Datos del alumno

Apellido paterno: Sánchez  
Apellido materno: Godínez  
Nombre(s): Jessica Yureri  
Teléfono: 5540384794  
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad: Facultad de Ciencias  
Carrera: Biología  
Número de cuenta: 315258446

### Datos del tutor

Grado: Dra.  
Nombre(s): Yolanda  
Apellido paterno: González  
Apellido materno: Hernández

### Datos del presidente

Grado: Dr.  
Nombre(s): Luis Horacio  
Apellido paterno: Gutiérrez  
Apellido materno: Gonzáles

### Datos del vocal

Grado: Dr.  
Nombre(s): Ricardo  
Apellido paterno: Valle  
Apellido materno: Ríos

### Datos del suplente 1

Grado: Dra.  
Nombre(s): Karen  
Apellido paterno: Bobadilla  
Apellido materno: Lozoya

### Datos del suplente 2

Grado: Dra.  
Nombre(s): Silvia  
Apellido paterno: Guzmán  
Apellido materno: Beltrán

### Datos del trabajo escrito

Título: Identificación de proteínas y RNA de Mycobacterium tuberculosis en exosomas de MDM infectados con la cepa virulenta de M. tuberculosis H37Rv y en exosomas de suero de pacientes con tuberculosis pulmonar multifarmacorresistente.  
Número de páginas: 61  
Año: 2023

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, por haber sido mi segunda casa, en donde conocí amigos, profesores, colegas, y en general personas brillantes con un corazón enorme y un gusto por aprender y enseñar ciencia. Gracias por brindarme las herramientas y permitir desarrollar habilidades para mi vida profesional.

A todos mis profesores, quienes fueron parte clave para ser quien soy ahora, quienes me enseñaron un sin fin de cosas, no solo académicas, enseñanzas de vida, y sobre todo me mostraron el amor a la ciencia y a la biología.

A mis colegas y amigos que conocí durante la carrera, y con los cuales forme lazos fuertes, me brindaron su amistad, su apoyo y me impulsaron a dar lo mejor de mí, me brindaron su hombro y su mano en los días complicados y crecimos juntos durante estos años.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por abrirme las puertas y permitirme realizar mi proyecto de tesis, brindándome las instalaciones como todo lo necesario para la realización de mi proyecto.

Les agradezco a mi comité tutorial, al Dr. Luis Horacio Gutiérrez González, al Dr. Ricardo Valle Ríos, a la Dra. Karen Bobadilla Lozoya y a la Dra. Silvia Guzmán Beltrán por brindarme su tiempo en la revisión de esta tesis, por sus comentarios constructivos y brindarme su orientación para el desarrollo de este proyecto.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora la Dra. Yolanda González, a quien le agradezco enormemente su apoyo, quien estuvo conmigo durante todo este proceso, quien me motivo cuando tuve momentos complicados, fue muy paciente y brindo tiempo y dedicación en compartirme sus amplios conocimientos sobre técnicas y campos de conocimiento necesarios para el desarrollo de mi tesis. Y a quien admiro demasiado, como la exitosa investigadora y como una gran persona.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres quienes han dado su vida por nuestro bienestar, agradezco todo el esfuerzo que han dedicado en darnos lo mejor a mis hermanos y a mí. Gracias por apoyarnos siempre, admiro lo fuertes que son y aprecio los sacrificios que han hecho durante estos años por sacarnos adelante. Los amo mucho.

A mi abuelito, a quien admiro demasiado, que fue una de las personas por las que decidí inclinarme al área dos, desde pequeña veía sus fotos con bata blanca y me inspiraba, alguien quien me ha apoyado toda la vida y me ha mostrado que con esfuerzo y dedicación puedes lograr grandes cosas.

A mi abuelita, mi segunda mamá, a quien amo con todo mi corazón, quien me ha enseñado el significado de fortaleza, y a quien agradezco por su apoyo incondicional, su amor, su ternura y comprensión.

A mi hermano, quien ha sido un ejemplo a seguir, quien desde pequeños nos ha guiado, agradezco tener a un hermano tan inteligente, gracias por festejar mis logros y estar para mí en los momentos difíciles, te amo inmensamente.

A mi hermana, mi alma gemela, te amo inmensamente, gracias por el apoyo incondicional día con día, quien me ha visto en mis peores momentos y me ha extendido su hombro y su mano, gracias por estar siempre, por motivarme y no dejar que me rinda. Gracias por ser mi soporte, mi despertador, mi confidente, mi consejera, gracias por todo.

Finalmente gracias a una de las personas que siempre he admirado, quien creyó en mí y en mi carrera desde el primer momento, quien me apoyo durante todo este proceso, quien me vio estresada, frustrada, enojada, triste y de quien recibí apoyo incondicional, motivación, y comprensión. Alguien que me inspiro a ser mejor cada día, a dar lo mejor de mí y fue un soporte enorme durante estos años. Cesar Vega Montiel

## **Índice**

Abreviaturas	8
<b>Resumen</b>	9
<b>Introducción</b>	10
<b>Antecedentes</b>	12
Tuberculosis	12
Características microbiológicas de <i>M. tuberculosis</i>	13
Cuadro clínico	14
Diagnóstico	14
Tratamiento farmacológico para la tuberculosis	16
Respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i>	18
Vesículas extracelulares	20
Exosomas	20
Papel de los exosomas	23
<b>Abordaje</b>	24
<b>Justificación</b>	25
<b>Pregunta de investigación</b>	25
<b>Hipótesis</b>	26
<b>Objetivo general</b>	26
<b>Objetivos particulares</b>	26
<b>Métodos</b>	26
Grupos de estudio	27
Criterios de inclusión	27

Criterios de exclusión	27
Muestras biológicas	28
Separación de PBMC por gradiente de densidad	28
Purificación de monocitos por selección positiva con Ac-anti CD14 por columna	29
Diferenciación de monocitos a macrófagos	30
Disgregación de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	30
Infección con cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	30
Aislamiento de exosomas	31
Extracción de proteínas de exosomas	31
Extracción de proteínas de sobrenadantes de cultivo de MDMs infectados in vitro con <i>M. tuberculosis</i>	32
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	32
Western blot	32
Preparación de geles de poliacrilamida SDS-PAGE	32
Electroforesis	33
Transferencia de Western blot	33
Tinción de Coomassie	34
Tinción con nitrato de plata	35
Caracterización de los exosomas	35
Detección de proteínas Ag85B, ESAT-6 y MPT64	35
Extracción de RNA de los exosomas	37
Amplificación de 5KST, ESAT-6, CFP10, 19kDa, Ag85C y 30kDa de <i>M. tuberculosis</i>	38
Análisis de resultados	39

<b>Resultados</b>	40
Presencia de proteínas en los exosomas de MDM-Mtb y exosomas de suero de pacientes con TB-MFR	42
Los exosomas Exo-MDM-Mtb y los Exo-TB-MFR contienen RNA de M. tuberculosis	49
<b>Discusión</b>	51
<b>Conclusión</b>	54
<b>Referencias</b>	54
<b>Anexos</b>	59
<b>Artículo exosomas</b>	61
<b>Artículo COVID</b>	61

## Abreviaturas

ADA	Asociación Americana de Diabetes
APC	Células Presentadoras de Antígeno
ATB	Enfermedad activa de tuberculosis
BAAR	Bacterias ácido-alcohol resistentes
BK	Baciloscopía
COVID 19	Enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Etambutol
ESCRT	Complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte
H	Isoniazida
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
ILV	Vesículas intraluminales
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDM	Macrófagos Derivados de Monocitos
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MVB	Cuerpos multivesiculares intracelulares
NK	Células Natural Killer
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
R	Rifampicina
RANTES/CCL5	Proteína reguladora en la activación, expresada y secretada por células T normales
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
S	Estreptomina
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis pulmonar multifarmacorresistente
TB-XFR	Tuberculosis extensivamente resistente
TCR	Receptores de células T
TLR	Receptores Tipo Toll
VE	Vesículas extracelulares
VIH/SIDA	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Z	Pirazinamida

## Resumen

La tuberculosis es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo debido a que comúnmente hay diagnóstico erróneo, el tratamiento para curar la enfermedad es muy largo (12 a 24 meses). Además, de la falta de seguimiento durante el tratamiento y el abandono de la farmacoterapia por los pacientes, permite la selección de cepas resistentes a los antibióticos de primera línea como: la isoniazida (H) y la rifampicina (R), conocida como tuberculosis fármacoresistente (TB-MFR). Actualmente se lleva a cabo la realización de baciloscopia (BK), para detectar la presencia del agente etiológico mediante cultivo de *M. tuberculosis* y la prueba de diagnóstico por PCR en muestras de esputo. Una vez que el paciente comienza el tratamiento, después de un tiempo (2-6 meses) se reduce la carga bacteriana, por lo que el paciente deja de expectorar y sin esta muestra no es posible tener un método de monitoreo durante el tratamiento. Por lo que es necesario implementar nuevos métodos de seguimiento. Por ello, el objetivo de este proyecto es la identificación de proteínas y RNA de *M. tuberculosis* en exosomas procedentes de MDM infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis H37Rv* y en 18 pacientes con TB-MFR al inicio del tratamiento y de seguimiento a los 3, 6 y 12 meses con el fin de utilizarlos como marcadores para monitorear la progresión de la enfermedad. Se realizó la detección de proteínas micobacterianas (AG85B, ESAT6 Y MPT64) por Western blot, y la detección de las secuencias de RNA (5KST, ESAT6, CFP10, 19kDa, Ag85 y 30kDa) por PCR. Los resultados muestran que los exosomas de MDMs infectados con *M. tuberculosis* contienen proteínas micobacterianas y fragmentos de secuencias de RNA de ESAT 6, de CFP10, la proteína de 19kDa, 30kDa, 5KST y el Ag85 después de 1 y 24 h de infección. En los exosomas séricos de los pacientes se detectaron las secuencias de 5KST y 30kDa. Con base

en los resultados se puede concluir que los exosomas de los pacientes con TB-MFR contienen material genético de *M. tuberculosis*, por lo que podría ser una alternativa eficaz para el seguimiento de la terapia farmacológica en los pacientes.

## **Introducción**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*); se estima que aproximadamente una tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*.<sup>1</sup> El tratamiento estándar para la TB pulmonar es efectivo y puede tener una eficacia hasta del 80%; sin embargo, una mala terapia o mal diagnóstico puede llevar a la generación de cepas resistentes de *M. tuberculosis*, como es el caso de la TB multifarmacorresistente (TB-MFR), caracterizada por la resistencia a los dos fármacos más efectivos, la isoniazida (H) y rifampicina (R), esta cepa es de difícil retratamiento y puede requerir hasta 25 meses de tratamiento, y solo alcanza una eficacia del 60%.<sup>2</sup>

En 2017 la TB-MFR contribuyó con aproximadamente el 14% de las muertes por tuberculosis a nivel mundial. El diagnóstico apropiado se realiza aproximadamente en el 70% de los pacientes con TB-MFR y el éxito del tratamiento es del 60-80%.<sup>3</sup>

Aunado a lo anterior, existen comorbilidades asociadas a la TBB que comprometen al sistema inmune, disminuyendo el éxito del tratamiento. En México, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la principal comorbilidad en el 49% de los casos con TB-MFR, pues altera la inmunidad de los pacientes, especialmente la inmunidad innata, provocando que los pacientes diabéticos sean más susceptibles a infecciones como TB, o incluso hacerla más

severa.<sup>2,4-7</sup> Durante el periodo de 2003 al 2012 se registró un incremento del 176% de los casos de TB-DM2 en México.<sup>8</sup>

Debido a lo anterior, es necesario contar con métodos que permitan monitorear la eficacia del tratamiento contra la TB en pacientes con TB-MFR, realizando ajustes terapéuticos tempranos y así incrementar su éxito, pues así se reduciría una posible resistencia adicional con cepas extensivamente resistentes (TB-XFR).<sup>9</sup>

Actualmente los métodos utilizados tanto para el diagnóstico, el seguimiento y el desenlace de la terapia son bacteriológicos e incluyen: 1) Baciloscopías: tinción del bacilo en muestras de esputo (expectoración), la cual no es lo suficientemente sensible para detectar poblaciones escasas de bacilos y puede detectar poblaciones de bacilos no viables dando una idea falsa de falla farmacológica. 2) Prueba de GeneXpert MTB/RIF: amplificación del material genético de *M. tuberculosis* con la detección del gen de resistencia a rifampicina; puede haber bacterias no viables que interfieran con el resultado dando falsos positivos. 3) Cultivo de *M. tuberculosis* en medios sólidos; considerada como la “prueba de oro”, tiene como principal limitación el tiempo de crecimiento de *M. tuberculosis*, que es de un mes. Aunado a las limitantes específicas de cada técnica, todas dependen de la muestra de esputo y, una vez que el tratamiento reduce el número de bacterias y el paciente deja de expectorar, no es posible tener un método de seguimiento o monitoreo de la eficacia a tratamiento. Es importante destacar que cuando el paciente no puede expectorar se realizan lavados broncoalveolares para llevar a cabo el diagnóstico. Sin embargo, este procedimiento es invasivo por lo que puede poner en riesgo la vida del paciente.<sup>8,10,11</sup>

El estudio de los exosomas es un área de investigación en auge, tanto con fines terapéuticos como para el diagnóstico. Los exosomas son vesículas extracelulares, unidas a membranas de tamaño nanométrico derivadas del proceso de exocitosis, son generadas principalmente por las células fagocíticas y transportan ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y metabolitos. Se ha demostrado que los exosomas tienen un papel en la comunicación intercelular, y en la inmunorregulación, ya que pueden desempeñar un papel en el desarrollo, reclutamiento, activación y supresión del sistema inmunológico.<sup>12,13</sup> Por lo anterior, este trabajo se enfocará a evaluar la utilidad de los exosomas como biomarcadores para el seguimiento del tratamiento de la TB resistente a fármacos identificando proteínas y/o material genético de *M. tuberculosis* dentro de ellos para asociarlos con tres estadios clínicos de los pacientes.

## **Antecedentes**

### **Tuberculosis**

La TB es una enfermedad causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*); esta enfermedad infecciosa afecta a millones de personas a nivel global, se estima que en el 2020 hubo 1.3 millones de muertes. Generalmente, la TB afecta los pulmones (TB pulmonar); sin embargo, puede afectar otros sitios como el sistema nervioso central, el sistema linfático, el sistema circulatorio, el sistema genitourinario, el sistema gastrointestinal, al hueso, a las articulaciones, incluso la piel (TB extrapulmonar) como resultados de la diseminación hematogena y linfática de *M. tuberculosis*.<sup>14,15 16 17</sup>

La TB puede afectar a cualquier persona sin importar su edad o sexo; sin embargo, se ha observado que la mayor parte de la población que desarrolla TB son adultos, y se han

reportado más casos en hombres que en mujeres, pues en el 2020 los hombres adultos representaron el 56% de todos los casos de TB.<sup>14</sup>

La TB es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y era la causa principal de muerte por un solo agente infeccioso, por encima del VIH/SIDA, hasta la pandemia de coronavirus (COVID-19). Sin embargo, la TB es curable, tiene tratamiento y este es efectivo. Se estima que alrededor del 85% de las personas que desarrollan TB por una cepa sensible a los fármacos pueden tener un tratamiento exitoso. No obstante, un tratamiento inadecuado, el abandono al tratamiento o las comorbilidades que comprometen la resistencia de los pacientes pueden llevar al fracaso del tratamiento y a la generación de cepas con resistencia a los fármacos, como es el caso de la tuberculosis multifarmacorresistente (TB-MFR), la cual se caracteriza por ser resistente a dos de los fármacos más efectivos los cuales son la isoniazida (H) y rifampicina (R), o en casos aún más graves, tuberculosis con resistencia extendida (TB-XFR) la cual se caracteriza por tener resistencia a isoniazida, rifampicina, una quinolona y uno o más de los tres antibióticos inyectables de segunda línea (kanamicina, amikacina y aureomicina).<sup>14,17</sup>

### **Características microbiológicas de *M. tuberculosis***

El *M. tuberculosis* pertenece al género *Mycobacterium*, las especies patogénicas son, *M. tuberculosis* o *M. leprae*. Se conocen más de 120 especies del complejo de *Mycobacterium*. Las micobacterias son bacilos inmóviles que no presentan cápsulas no forman esporas. Su envoltura consiste en una membrana citoplasmática y una pared celular con un elevado contenido de lípidos, esta pared contiene un grupo heterogéneo de peptidoglicanos, glicolípidos fenólicos y sulfolípidos, todos estos de gran importancia para la patogénesis. A pesar de tener la estructura de una bacteria Gram (+) no toman la coloración de Gram, se

caracterizan por ser ácido-alcohol resistentes (BAAR), esto se debe a la presencia de ácidos micólicos, los cuales son exclusivos de las especies de *Mycobacterium*. La tinción de ácido-resistencia (Zhiel-Neelsen) es la más común utilizada como método de diagnóstico.<sup>18 19 16</sup>

20 21

### **Cuadro clínico de la tuberculosis pulmonar**

Los signos y síntomas clínicos más frecuentes que presenta una persona que tiene TB pulmonar son: la tos prolongada (por más de dos semanas), presencia de flemas y/o sangre en la expectoración, dolor de pecho, debilidad o fatiga, pérdida de peso, caquexia, astenia, fiebre o febrícula y diaforesis nocturna. A pesar de estos síntomas, al presentarse síntomas leves es difícil que los pacientes busquen atención médica.<sup>22,23,24</sup>

### **Diagnóstico de tuberculosis**

El diagnóstico se lleva a cabo a partir de signos y síntomas clínicos, epidemiología, pruebas radiológicas y confirmación microbiológica.<sup>21,23</sup>

La exploración clínica incluye la recopilación de signos y síntomas; el análisis epidemiológico es la correlación realizada con otros casos de TB en la zona, mientras que las pruebas radiológicas permiten identificar la localización y extensión de lesiones. Aunque no existan lesiones en el estudio, no se descarta la sospecha de la enfermedad, y la confirmación microbiológica consiste en la búsqueda de la presencia de BAAR por medio de baciloscopía o cultivo, y en los últimos años se han incorporado técnicas de amplificación genética GeneXpert MTB/RIF.<sup>21,23</sup>

La baciloscopía es la prueba más rápida, simple y económica. En general, esta prueba ayuda al diagnóstico de la enfermedad, a monitorear el tratamiento e indica la cantidad de bacterias que tiene el paciente en la expectoración. La identificación de bacilos se hace mediante la tinción Zhiel- Neelsen o tinción de Kinyoun. Para realizar la prueba se deben obtener tres muestras: la primera es tomada en la primera cita, la segunda muestra debe ser recolectada al despertar por la mañana del siguiente día en un frasco proporcionado por el personal de salud, la última muestra se recolecta en el momento que es entregada la segunda muestra a la unidad de salud. Entre las limitaciones se encuentran la sensibilidad, ya que es difícil detectar poblaciones escasas de bacilos; para ser considerada una prueba negativa, es necesario que la muestra tenga 5000-10000 bacterias/ml. Es importante recalcar que el técnico debe tener experiencia previa para identificar de manera eficaz a la micobacteria y pueda diferenciar entre un bacilo viable y uno no viable, así como identificar a la micobacteria de otras especies. Existe una escala la cual se expresa con cruces (+), de 0 a 4 cruces, esta sirve como una aproximación cuantitativa de la carga bacteriana.<sup>21,23,17,24</sup>

En el cultivo de *M. tuberculosis*, considerado la prueba más sensible o “prueba de oro”, la positividad se observa en 100-1000 bacterias/ml, 50-100 veces más sensible que la baciloscopía. Los medios de cultivo son específicos, los más conocidos son los sólidos como el Lowenstein-Jensen y el Middlebrook 7H10 y 7H11. Se considera un procedimiento más complejo que la baciloscopía y la amplificación genética por GeneXpert MTB/RIF, y un poco más costosa que la baciloscopía. La principal limitación de esta técnica es el crecimiento lento de las *M. tuberculosis*, que puede requerir varias semanas. Un tiempo aproximado son de 1 a 12 días en las muestras en la que la baciloscopía es

positiva, y de 15 a 30 días en las muestras en las que la baciloscopía salió negativa. <sup>21,23 17</sup>

24

La amplificación genética por la técnica de GeneXpert, detecta la presencia de *M. tuberculosis* y el de los genes de resistencia a los antibióticos. Esta es una plataforma integrada que puede usarse de manera sencilla, con experiencia mínima, a diferencia de los métodos anteriores. Sin embargo esta prueba tiene un límite de detección, pues no puede distinguir bacterias no viables las cuales causaran un resultado falso positivo, por lo que el ensayo de GeneXpert MTB/RIF tiene una alta sensibilidad, con baja especificidad. <sup>10,2121</sup>

### **Tratamiento farmacológico para la tuberculosis**

El tratamiento para la TB interrumpe la replicación de *M. tuberculosis*, logra curar al paciente y evita la muerte. El tratamiento para la TB se observa en la Tabla 1; la fase intensiva del tratamiento consta de 60 dosis. Los fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento primario de la TB son: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) o estreptomina (S). La fase de sostenimiento consta de 45 dosis con dos fármacos H y R. Un dato importante es que, en caso de que el paciente suspenda el tratamiento por 30 días o más, se considera abandono, y se reiniciará el tratamiento primario. <sup>11,17,24 21</sup>

**Tabla 1.** Fármacos indicados para el tratamiento de TB pulmonar. (Secretaría de Salud, 2013)

Principio activo	Dosis recomendada		Presentación	Efectos adversos	Interacciones	Contraindicaciones
	Niños mg/kg peso	Adultos mg/kg peso				
Isoniazida (H)	10-15mg	5-10mg	Comprimidos de 100mg	Neuropatía periférica Hepatitis	Los antiácidos disminuyen la absorción, la carbamacepina aumenta el riesgo de hepatotoxicidad. Los corticosteroides disminuyen la eficacia de la isoniazida. Con disulfiram se presentan síntomas neurológicos.	Hipersensibilidad al fármaco, insuficiencia hepática o renal. Precauciones: Alcoholismo crónico
Rifampicina (R)	15mg	10mg	Cápsulas 30mg	Hepatitis, hipersensibilidad, interacciones medicamentosas	Afecta la actividad de: anticonvulsivantes, antiarrítmicos, antipsicóticos, anticoagulantes orales u otros: fluconazol, antirretrovirales, barbitúricos, bloqueadores betaadrenérgicos, corticosteroides, ciclosporina, glucósidos cardíacos, clofibrate, anticonceptivos hormonales sistémicos, dapsona, benzodiacepínicos	Hipersensibilidad a las rifamicinas
Pirazinamida (Z)	25-30mg	20-30mg	Comprimidos de 500mg	Gota, hepatitis	Usarse con precaución en pacientes con antecedentes de gota. Tiene propiedades inductoras y junto con la isoniazida tiene propiedades inhibitorias sobre determinadas enzimas del citocromo P-450	Hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de las fórmulas
Etambutol (E)	20-30mg	15-25mg	Comprimidos 400mg	Alteración de la visión	Se debe administrar con otros antituberculosos para incrementar su efecto terapéutico.	Hipersensibilidad al fármaco, neuritis óptica y en menores de 12 años. Precauciones: insuficiencia renal
Estreptomina (S)	20-30mg	15mg	Ampolleta 1g	Vértigo, hipoacusia, dermatosis	Con anestésicos generales y bloqueadores neuromusculares potencializa el bloqueo neuromuscular. Con cefalosporinas aumenta la nefrotoxicidad. Con diuréticos de asa aumenta la ototoxicidad, el dimenhidrinato enmascara los síntomas ototóxicos	Hipersensibilidad al fármaco. Precauciones: insuficiencia renal

La H y R son los fármacos más efectivos para el tratamiento de la TB pulmonar, en la Tabla 2 se muestra el mecanismo de acción de cada fármaco. Uno de los problemas más frecuentes a la hora del tratamiento son las reacciones adversas que los pacientes pueden presentar, y este es un factor por el cual muchos pacientes optan por el abandono, incrementando la posibilidad de generar una cepa resistente. La Tabla 3 presenta las reacciones adversas de la H y R más a profundidad, así como los síntomas y como se recomienda actuar si estos se presentan.

**Tabla 2.** Mecanismos de acción de la isoniazida y rifampicina. (Dookie, 2018)

Fármaco	Mecanismo
Isoniazida (H)	Profármaco activado por la enzima catalasa/peroxidasa, la cual es codificada por el gen katG. La isoniazida inhibe la síntesis de ácido micólico a través de la proteína reductasa portadora de enoil-acilo dependiente de NADH, la cual es codificada por el gen inhA .
Rifampicina (R)	Fármaco antituberculoso eficaz contra los bacilos que se metabolizan activamente y lentamente, se une a la subunidad $\beta$ del RNA polimerasa, lo que resulta en la inhibición de la enlongación del RNAm

**Tabla 3.** Reacciones adversas de la isoniazida y rifampicina (García, 2003)

Fármaco	Reacciones adversas	Signos y síntomas
Isoniazida (H)	Elevación de enzimas hepáticas, hepatitis, neuropatía, efectos en el sistema nervioso central	Náusea, vómito, dolor abdominal, abstinencia, coluria, sensación hormigueo en manos y pies
Rifampicina (R)	Hepatitis, hemorragia, efectos en el sistema nervioso central, hipersensibilidad, reacciones cutáneas.	Náusea, vómito, dolor abdominal, abstinencia, cefalea, insomnio, coluria, síntomas semejantes a la gripe

### **Respuesta inmune contra *M. tuberculosis***

La transmisión de *M. tuberculosis* ocurre por vía respiratoria, a través de la inhalación de gotas en aerosol las cuales contienen a los bacilos vivos, la transmisión exitosa dependerá de diversos factores como la proximidad y la duración del contacto con la persona con la enfermedad activa de TB (ATB) y la respuesta inmunológica de la persona receptora. <sup>25</sup>

El primer contacto que se establece entre el hospedero y el patógeno es entre los macrófagos y *M. tuberculosis*. Los macrófagos reconocen al patógeno a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los componentes micobacterianos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones citosólicos (PRR), como cGAS y STING, los cuales detectan DNA y participan en la defensa antimicrobiana. El DNA de *M. tuberculosis* y los segundos mensajeros son reconocidos por los PRR, lo que resulta en la producción de citocinas (IL-2, IFN $\gamma$ , IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-8, entre otras) y la autofagia. También se reconoce una variedad de antígenos de *M. tuberculosis* por los TLR (ESAT-6 (TLR 2), Ag85 (TLR 2), 30kDa (TLR 2), 19kDa (TLR 2), 27kDa (TLR 2), 38kDa (TLR 2 y TLR 4), entre otras). Se ha encontrado que la respuesta del hospedero hacia las micobacterias es el resultado de la activación de múltiples vías de señalización, como por ejemplo, la vía de señalización de IL-1, la cual es necesaria para la resistencia a la infección de *M. tuberculosis*.<sup>25-28</sup>

A pesar de esos mecanismos de reconocimiento, *M. tuberculosis* ha desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune y persistir en el hospedero. Esta modulación de la respuesta inmune de *M. tuberculosis* se debe a la presencia de componentes lipídicos inmunoinhibidores, como los sulfoglucolípidos tetraacilados, o a través de medios enzimáticos, por ejemplo, la serina-hidrolasa, pueden inhibir la respuesta inmune innata, por lo que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de sobrevivir y replicarse dentro del fagosoma.<sup>25</sup>

Aunque se ha demostrado que la infección por *M. tuberculosis* altera la presentación de antígenos evadiendo la respuesta inmune de las células T. Se ha sugerido que esta infección

disminuye la expresión de MHC de clase II en los macrófagos a través de la inhibición del transactivador de clase II, el cual es un regulador transcripcional que controla la expresión de las moléculas de MHC de clase II. <sup>25,26</sup>

### **Vesículas extracelulares**

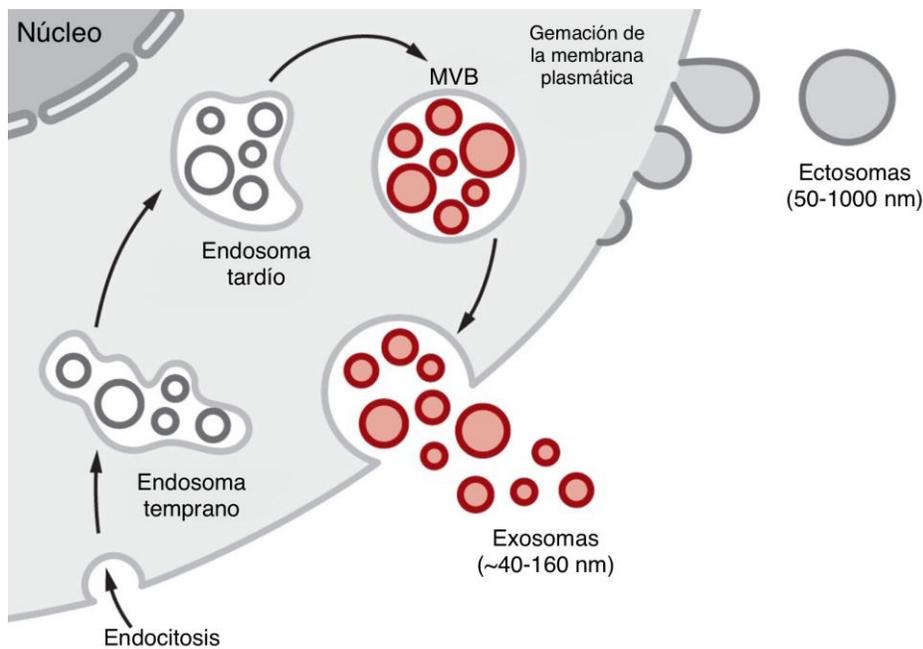
Las células, tanto procariontes como eucariontes, liberan vesículas extracelulares (VE) como parte de su fisiología normal, que se pueden clasificar de acuerdo con su tamaño y su origen en dos categorías: ectosomas y exosomas. Los ectosomas o microvesículas (MV) son vesículas que se forman a partir de una depresión llamada vesícula endocítica en la superficie de la membrana plasmática, posteriormente se desprenden de la membrana; y se invaginan en el lumen, dando lugar a las vesículas endosómicas intraluminales, los exosomas son VE de origen endosómico con un rango de tamaño de ~ 40 a 160 nm (promedio ~ 100 nm) de diámetro (Figura 1). <sup>13 29 30</sup>

### **Exosomas**

Los exosomas se originan de un sistema endosómico, se forman como vesículas intraluminales (ILV) en los cuerpos multivesiculares (MVB) a partir de la invaginación de la membrana plasmática, y se dividen en endosomas tempranos, endosomas tardíos y endosomas de reciclaje. Dentro de los exosomas, se han identificado proteínas citoplasmáticas, nucleares, endosomales y membranales, dentro de toda esta variedad destacan las proteínas involucradas en la biogénesis exosomal (miembros de complejo ESCRT), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, entre otras), proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90, entre otras) y moléculas de histocompatibilidad clase I y clase II. Algunas

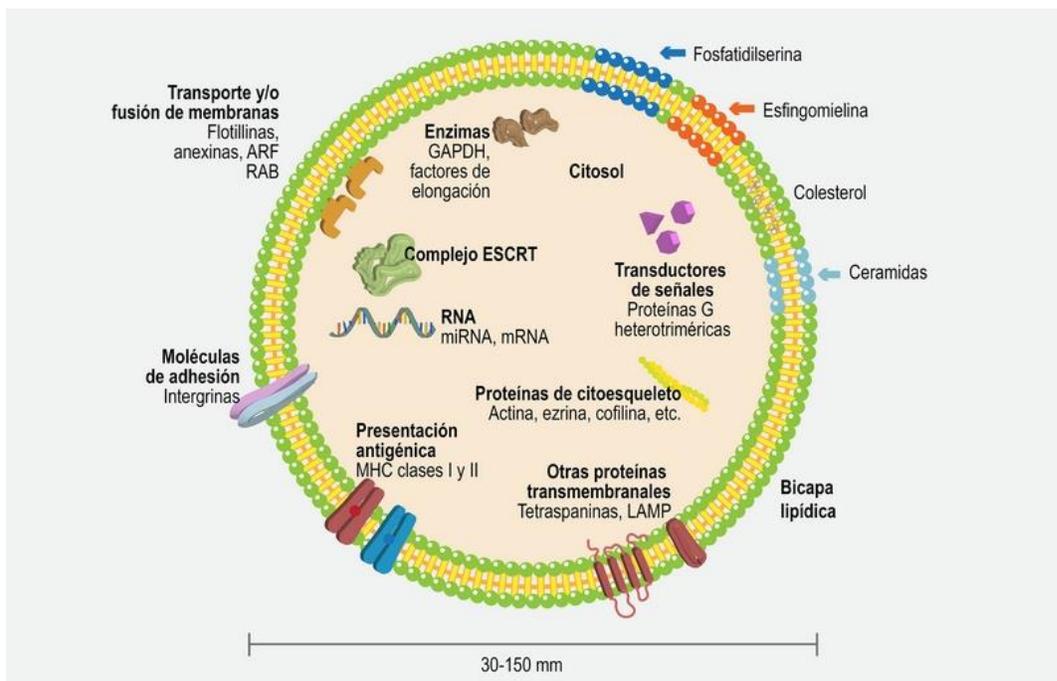
de las funciones importantes de los exosomas son acarrear mediadores solubles como las citocinas y la comunicación intercelular en el sistema inmunológico.<sup>29</sup>

Existe una amplia evidencia sobre las vesículas extracelulares y su papel en la secreción de pequeñas moléculas solubles (el secretoma) y el contacto célula-célula. Se ha demostrado que estas vesículas contienen diversas proteínas, azúcares, lípidos y una amplia variedad de materiales genéticos, como DNA, RNA mensajero (RNAm) y RNA no codificante.<sup>30</sup> En la figura 1 se ilustran los diversos tipos de vesículas extracelulares.



**Figura 1.** Origen de los exosomas. Las vesículas extracelulares se clasifican en dos principales categorías, ectosomas y exosomas. Los ectosomas se originan a partir de un proceso de gemación directa hacia afuera de la membrana plasmática. En el caso de las exosomas, estos son generados a partir de un proceso de doble invaginación de la membrana plasmática, estos se forman en los cuerpos multivesiculares (MVB) como vesículas intraluminales (ILV). (Modificada de Kalluri, et al., 2020.)

Los exosomas están compuestos por una bicapa lipídica enriquecida en diversos lípidos y proteínas transmembranales. El contenido exosomal es variable y depende de las condiciones fisiológicas en las que se encuentren las células que los liberan. En general, contienen proteínas en su mayoría citosólicas derivadas de la célula de procedencia con funciones enzimáticas implicadas en transducción de señales, adhesión, presentación de antígenos o coestimulación y proteínas propias de la génesis exosomal, también posee diversos tipos de RNA, incluyendo RNA mensajero (mRNA), microRNA (miRNA) y RNA largos no codificantes (LncRNA) (Figura 2) <sup>29</sup>



**Figura 2.** Composición de los exosomas. La composición de los exosomas se basa en una bicapa lipídica la cual se encuentra enriquecida por lípidos y proteínas. Su contenido varía según las diferentes condiciones fisiológicas a las que se encuentre sometida la célula que lo genera, en su interior contienen diversas proteínas las cuales derivan de las células que las genera, pueden estar implicadas en la transducción de señales, adhesión, presentación de antígenos, entre otras funciones. (Maravillas-Montero, 2017)

Se ha demostrado que los exosomas modulan la respuesta inmune ya que pueden promover o controlar algunas enfermedades infecciosas. Estos transportan proteínas, metabolitos, ácidos nucleicos a las células receptoras afectando la respuesta biológica; esta variabilidad de moléculas presentes en los exosomas proporciona las capacidades funcionales que ejerce en las células blanco, por ello, pueden ser útiles como biomarcadores, considerando que un biomarcador puede definirse como una característica distintiva medible capaz de identificar algún proceso biológico normal, patológico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. <sup>13 29 31</sup>

### **Papel de los exosomas en la tuberculosis**

Se han identificado a 40 proteínas micobacterianas en los exosomas aislados de macrófagos infectados con *M. tuberculosis*; estas proteínas estaban compuestas predominantemente por el complejo antigénico 85 y la proteína de choque térmico HSP70, incrementando la respuesta proinflamatoria. <sup>31 32 33</sup>

Kruh-García en el 2014, reportó 20 proteínas, y péptidos de 8 proteínas conocidas de *M. tuberculosis* (Antígeno 85B, Antígeno 85C, Apa, BfrB, GlcB, HspX, KatG y Mpt64), como posibles marcadores para la detección de TB activa. Ensayos in vitro de exosomas aislados de macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, se identificaron 41 proteínas micobacterianas como: ESAT-6 (Rv3875), complejo Ag85 (Rv3804c, Rv1886c, Rv0129c), MPT64 (1980c) y MPT63 (1926c) por proteómica, adicionalmente, se identificaron las proteínas GroES (Rv3418c), MPT63 (Rv1926c), KatG (Rv1908c), la lipoproteína 19 KDa/LpqH (Rv3763), el complejo de antígeno 85 (Rv3804c, Rv1886c, Rv0129c), GlnA (Rv2220) y SodA (Rv3846) por Western blot, estos estudios sugieren que los exosomas

extraídos de suero de pacientes podrían ser utilizados como biomarcadores específicos para la detección de la TB activa.<sup>34 35</sup>

## **Abordaje**

En esta propuesta se pretende identificar el material genético (RNA) o proteínas de *M. tuberculosis* en exosomas de MDM infectados con *M. tuberculosis* para su posterior identificación en exosomas séricos de pacientes con TB-MFR, y dilucidar la posible correlación de la presencia de los exosomas con la partícula de *M. tuberculosis* con el tiempo de negativización del cultivo y a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento.

El interés de evaluar a los exosomas de pacientes con TB es porque estas microvesículas pueden migrar desde el pulmón a la sangre periférica.<sup>31</sup> La composición interna de los exosomas depende de la composición intracelular de la célula que la originó, así como de su estado fisiológico, de tal forma que puede contener material genético del patógeno y del hospedero.<sup>36,37</sup> Con base a lo anterior es posible identificar material genético de *M. tuberculosis* en exosomas extraídos del suero de pacientes para identificar marcadores asociados a la terapia farmacológica exitosa en pacientes con TB-MFR.

Actualmente, existe evidencia de que secuencias de RNA *M. tuberculosis* se encuentran dentro de los exosomas como se describe en el artículo de Lorente, et al., 2019, y Mehaffy, et al., 2017, en donde se encontraron diferentes secuencias como Ag85C, Mpt64 las cuales, se encuentran dentro de los exosomas extraídos de suero de pacientes, concluyendo que podrían ser utilizados como marcadores específicos para la detección de TB activa.<sup>32,38</sup>

En el presente estudio primero se identificaron diferentes secuencias y proteínas de *M. tuberculosis* en MDM infectados *in vitro* con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* y posteriormente se analizaron en los pacientes los exosomas del suero de los pacientes TB-MFR en diferentes estadios clínicos.

### **Justificación**

Las principales causas de atención de TB pulmonar en el INER son la TB-MFR. Debido a que hasta el día de hoy no se cuenta con marcadores para el monitoreo del tratamiento farmacológico en este grupo de pacientes, se pretende identificar proteínas y RNA de *M. tuberculosis* en los exosomas del suero de los pacientes, lo que nos permitirá identificar marcadores del patógeno para monitorear la respuesta al tratamiento.

Esta técnica permitirá en el futuro identificar fallas farmacológicas tempranas que permitan tomar medidas de intervención terapéuticas en estos pacientes de difícil re-tratamiento, así como también puede ser útil para monitorear terapias individualizadas en aquellos pacientes en donde no es efectiva una terapia estandarizada.

### **Preguntas de investigación**

¿Las proteínas y el RNA de *M. tuberculosis* que son transportados dentro de los exosomas desde el pulmón a la sangre en pacientes con TB-MFR activa pueden ser útiles como marcadores del patógeno para monitorear la respuesta al tratamiento?

## **Hipótesis**

Las proteínas (Ag85B, ESAT-6 y MPT64), y el RNA (secuencias de los antígenos MPB64, MPT64, 5KST, ESAT-6, CFP10, 19kDa, Ag85C y 30kDa) de *M. tuberculosis* se encuentran en exosomas de MDM infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, así como en los exosomas del suero de los pacientes con TB-MFR.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Identificar proteínas y RNA de *M. tuberculosis* en exosomas de MDM infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y en exosomas séricos de pacientes con TB-MFR.

### **Objetivos particulares**

1. Analizar las proteínas de *M. tuberculosis* Ag85B, ESAT-6 y MPT64 en exosomas de MDM infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y en exosomas aislados de suero de pacientes con TB-MFR antes de iniciar el tratamiento, y a los 3, 6 y 12 meses después del tratamiento por Western blot.
2. Analizar las secuencias de RNA de los antígenos de *M. tuberculosis* MPB64, MPT64, 5KST, ESAT-6, CFP10, 19kDa, Ag85C y 30kDa por PCR en exosomas de MDM infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y en exosomas aislados de suero de pacientes con TB-MFR antes de iniciar el tratamiento, y a los 3, 6 y 12 meses después del tratamiento.

## **Métodos**

### **Grupos de estudio**

Grupo 1. Hombres y mujeres sanos entre 18-60 años, sin ninguna enfermedad clínica y mujeres no embarazadas.

Grupo 2. Sueros de 18 pacientes con tuberculosis activa multifarmacorresistente (TB-MFR) a los 0, 3, 6, y 12 meses de tratamiento.

1. Los criterios de inclusión fueron:

- TB confirmada bacteriológicamente con baciloscopia y cultivo de *M. tuberculosis* en cuyas pruebas de susceptibilidad existía resistencia a los fármacos de primera línea isoniazida (H) y rifampicina (R)
- Hombres y mujeres mayores de 18 años.
- Pacientes que otorguen su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

2. Criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con contraindicación médica para recibir tratamiento con fármacos anti-tuberculosis.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con VIH.

## **Muestras biológicas**

-Sangre periférica. Se tomó una muestra de sangre periférica de seis sujetos sanos para obtener los monocitos y diferenciarlos a macrófagos.

-Suero. Se utilizaron sueros de las muestras biológicas de los pacientes con TB-MFR en un banco de sueros del Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria. Las muestras fueron obtenidas durante el desarrollo de protocolos previos en un periodo de 7 años y en donde se solicitó a los pacientes su autorización para conservar las muestras para la realización de proyectos de investigación futuros, mediante una carta de consentimiento informado (se cuenta con la carta de consentimiento). Los protocolos fueron autorizados por el Comité de Ciencia y Bioética del INER. Número de protocolo: C44-17.

## **Separación de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) por gradiente de densidad**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron utilizando la solución de Lymphoprep 07801\_07851 (STEMCELL Technologies, Canadá).

Se realizó una dilución de la sangre (1:1) con medio RPMI 1640 (Lonza Bioscience, USA). Posteriormente se agregó la solución separadora de linfocitos, Lymphoprep 07801\_07851 (STEMCELL Technologies, Canadá), y se centrifugó a 1200 rpm a temperatura ambiente por 45 min, una vez centrifugado se identificó el anillo leucocitario (PBMC) entre la solución separadora de linfocitos y el plasma sanguíneo, y esta se transfirió a un tubo nuevo. Se realizaron 3 lavados y se resuspendió el botón celular en medio RPMI suplementado con glutamina y gentamicina (RPMI G+G) 1640 (Lonza Bioscience, USA).

La viabilidad celular se evaluó utilizando el colorante azul de tripano, y el conteo celular se realizó en la cámara de Neubauer.

### **Purificación de monocitos por selección positiva con anti-CD14 por columna.**

La purificación de monocitos se realizó a partir de las PBMC, utilizando perlas impregnadas con anticuerpos anti-CD14, microesferas MACS (Magnetic-activated cell sorting) CD14 MicroBeads UltraPure human 130-118-906 (Miltenyi Biotec, Alemania), la columna utilizada fue LS-MACS.

La separación se llevó a cabo haciendo pasar la muestra (PBMC) a través de una columna con esferas ferromagnéticas. Cuando la columna se coloca sobre un imán las esferas atraen a las microesferas MACS (Miltenyi Biotec, Alemania) y las células unidas a ellas (monocitos). La unión de las microesferas con un anticuerpo anti-CD14 se une a la molécula CD4 expresada en los monocitos, lo que permite que las microesferas y las células unidas a ellas (monocitos) queden retenidas en el interior de la columna. La columna se lavó tres veces con buffer PBS+BSA (Roche, Suiza), posteriormente se retiró la columna del imán, y se colocó sobre un tubo de 15 ml y con ayuda de un émbolo se eluyeron los monocitos. Se centrifugó a 1500 rpm por 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, la viabilidad celular se evaluó con el colorante azul de tripano siendo mayor a 95%, los monocitos se contaron en la cámara de Neubauer y se adicionó medio RPMI (Lonza Bioscience, USA) para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  monocitos por ml.

### **Diferenciación de monocitos a macrófagos**

1x10<sup>6</sup> monocitos son cultivados en 1ml de medio RPMI suplementado con glutamina 1640 (Lonza Bioscience, USA) y 10% de SFB libre de exosomas (Cytiva HyClone, USA), en una placa de 24 pozos y se incubaron durante 7 días para su diferenciación a macrófagos.

### **Disgregación de *M. tuberculosis H37Rv***

Para realizar la disgregación, se descongeló un vial de *M. tuberculosis* y se colocaron 5 perlas de vidrio estériles (3 mm de diámetro), se agitó en vórtex durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 800 rpm por 2 minutos. El sobrenadante que contiene las bacterias individuales se transfirió a un vial nuevo. Las bacterias se diluyeron en medio RPMI 1640 (Lonza Bioscience, USA), para tener una concentración de 10x10<sup>6</sup>/ml.

### **Infección con la cepa de *M. tuberculosis H37Rv***

Se retiró el sobrenadante de las células diferenciadas y se adicionó 1 ml de medio RPMI+G 1640 (Lonza Bioscience, USA) + SFB libre de exosomas (Cytiva HyClone, USA) por pozo. Se adicionaron 10x10<sup>6</sup> bacterias y se incubó a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> durante 1h. Después se recuperó el sobrenadante (etiquetado como 1h) y a la placa de MDMs se les adicionó medio RPMI+G 1640 (Lonza Bioscience, USA) + SFB libre de exosomas (Cytiva HyClone, USA) y se incubaron durante 24h, después se recuperó el sobrenadante (etiquetado como 24h). Los sobrenadantes fueron filtrados por un filtro de pirinola de 0.22 um y se almacenaron a -20°C hasta la purificación de los exosomas.

### **Aislamiento de exosomas**

Los exosomas se aislaron a partir de suero utilizando el kit de extracción, EXOQuick (EXOxxx-1, System Biosciences, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Del sobrenadante de los cultivos de macrófagos derivados de monocitos (MDM) infectados con *M. tuberculosis* se aislaron los exosomas utilizando el kit Total Exosome Isolation, Invitrogen 4478359 (Thermo Fisher Scientific, España) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, por cada 1ml de sobrenadante se adicionaron 100  $\mu$ l del reactivo Total Exosome Isolation (Thermo Fisher Scientific, España) y se agitó en el vórtex hasta obtener una solución homogénea. Las muestras se incubaron a 8°C toda la noche, posterior a este paso se agitaron en un vórtex y se transfirió la suspensión a tubos para microcentrífuga. Se centrifugaron las muestras a 10,000g 4°C durante 1 hora y se decantó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet (exosomas) en 200  $\mu$ l de PBS.

### **Extracción de proteínas de los exosomas.**

La extracción de proteínas se realizó de 100  $\mu$ l de los exosomas con Buffer RIPA 89900 (Thermo Fisher Scientific, España). Brevemente, por cada 100  $\mu$ l de exosomas se adicionó 1 ml de buffer RIPA (Thermo Fisher Scientific, España) y se incubó en hielo durante 5 minutos, después se centrifugó a  $\sim 14\ 000 \times g$  durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación (Figura 3).

### **Extracción de proteínas de los sobrenadantes de cultivos de MDM infectados *in vitro* con *M. tuberculosis*.**

Se realizó un pool (se reunieron todas las muestras en un mismo tubo) de los exosomas extraídos de los MDMs de los seis sujetos sanos de cada condición (se unieron en un mismo tubo): No infectados, infectados por 1hr e infectados por 24hrs. Posteriormente se concentraron las muestras del pool en una centrífuga de vacío a 30°C durante 40 minutos (Figura 3).

### **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford. En una placa de 96 pozos, se colocó 4 µl de BSA (Roche, Suiza) a 1, 0.75, 0.5, 0.25, and 0.125 mg/ml para tener una curva de referencia, se adicionó 4 µl de agua como control negativo (blanco), y 4 µl de las muestras por duplicado. A cada muestra se le adicionó 196 µL del reactivo de Bradford 1X (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA), se mezcló en el agitador de microplacas 5 minutos y se cuantificó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro visible para microplacas Epoch (BioTek, USA) (Figura 3).

### **Western blot**

#### **Preparación de geles de poliacrilamida SDS-PAGE**

Los geles de poliacrilamida se prepararon al 15% siguiendo las indicaciones del fabricante. Se montaron los soportes y los vidrios, para proceder a adicionar el TEMED (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) a la solución del gel resolvente, por el cual se separarán las

proteínas con base en su peso, y se adicionó poco a poco la solución del gel resolvidor hasta llegar a la línea marcada del vidrio, después se adicionó 1 ml de etanol. Una vez polimerizado el gel resolvidor se decantó el etanol y con ayuda de un papel filtro se retiró el remanente de etanol en el gel. Posteriormente se adicionó el TEMED (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) a la solución del gel concentrador, el cual contiene acrilamida-bisacrilamida, buffer Tris-HCl 0.5 M (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA), SDS 10% (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) y PSA 10% (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA), y se adicionó sobre el gel resolvidor hasta donde terminan los vidrios, inmediatamente se colocaron los peines (Figura 3).

### **Electroforesis**

Se ajustó la cantidad de proteína 1:1 con el buffer de carga 2X (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) con  $\beta$ -ME (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

Las muestras se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se colocaron los geles en los cassettes, se cargó el peso molecular (Precision Plus Protein Dual Xtra Standard (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)) y las muestras y se llenó la cámara con buffer de corrida 1X, el cual contiene Tris Base (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA), glicina (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) y SDS (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA). Las muestras se corrieron a 100 V (Figura 3).

### **Transferencia del Gel**

Se cortó el gel concentrador y se pre-humedecieron las membranas PVDF 0.45  $\mu$ m en metanol absoluto (J.T. Baker, España) durante 30s, se eliminó el metanol adicionando buffer de transferencia 1X, el cual contiene Tris 25mM (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) y

glicina (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) por 5 min y después se equilibró con buffer de transferencia 1X y con metanol 20% (J.T. Baker, España) por 10 minutos. El gel se colocó en la membrana y el papel filtro pre-humedecido en buffer de transferencia 1X con metanol, se retiran las burbujas, se puso la fibra, y se colocó en la cámara de transferencia, se llenó la cámara con el buffer de transferencia 1X y corrió a 350 MA durante 1.5h. Al finalizar la transferencia, las membranas se dejaron secar y posteriormente se llevó a cabo el western blot. Para ello las membranas se bloquearon las membranas con BSA 1% (Roche, Suiza) + TBS Tween 1X 0.05% (Sigma-Aldrich, Alemania) / Leche reducida en grasa al 5% en TBS Tween 1X (Sigma-Aldrich, Alemania) (Figura 3).

### **Tinción de Coomassie**

Los geles se incubaron con solución de azul de Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) en agitación suave durante toda la noche. Posteriormente se retiró de la solución de tinción y se realizaron 5 lavados con solución desteñidora (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) por 15 min y 2 lavados con agua destilada por 15 min. La imagen fue analizada con el equipo fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) para el análisis de las proteínas.

### **Tinción con nitrato de plata**

En los geles en los que no se observaban proteínas con la tinción de Coomassie, se realizó una tinción de nitrato de plata para detectar concentraciones de proteínas entre 2 a 5 ng. Los geles se fijaron en solución fijadora Fixing solution (Sigma-Aldrich, Alemania) por 30 min, posteriormente se lavó con etanol y luego con agua ultrapura, durante 10 min cada uno. Después se adicionó solución sensibilizadora Sensitizer solution (Sigma-Aldrich, Alemania) y se incubó durante 10 min, y se realizaron dos lavados con agua ultrapura 20 min. El gel se equilibró con solución de plata Silver solution (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 10 min y se lavó con agua ultrapura por 1 min. El revelado se realizó con Developer solution (Sigma-Aldrich, Alemania) por 5 min, se adicionó la solución de paro ProteoSilver Stop Solution (Sigma-Aldrich, Alemania) por 5 min, y se realizó un lavado con agua ultrapura por 15 min. El gel se analizó en el equipo fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

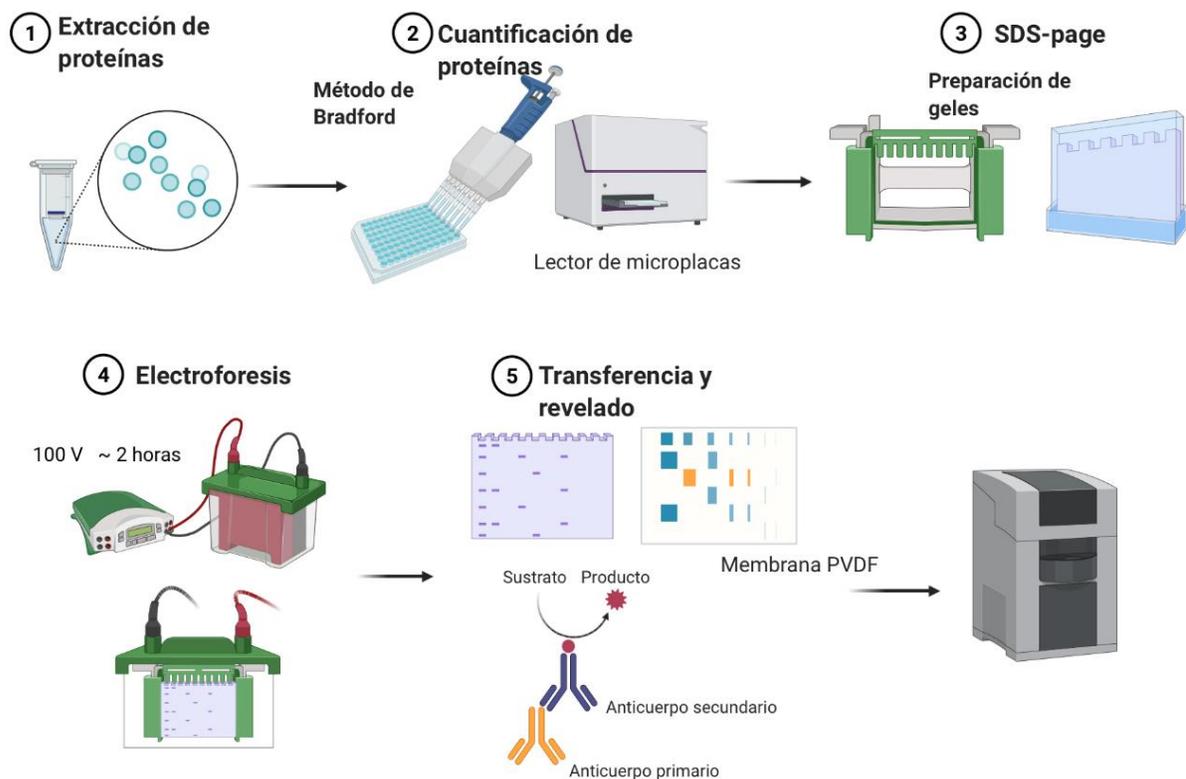
### **Caracterización de exosomas.**

Los exosomas se caracterizaron por la presencia de los marcadores de CD9, CD63 y CD81 y la proteína de choque térmico HSP70 utilizando el kit ExoAb Antibody Kit (System Biosciences, USA). o con el anticuerpo anti-CD63 (antibody ab216130 Abcam, England) (Figura 3).

### **Detección de las proteínas Ag85B, ESAT-6 y MPT64 por Western blot**

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de acuerdo con la tabla inferior en TBS-Tween-BSA 1% durante 3 h, posteriormente se realizaron 2 lavados de 10 min y 3 lavados de 5 min con TBS 1X + Tween20. Se adicionó el respectivo anticuerpo secundario de acuerdo con la tabla inferior y se incubó durante 1h, posteriormente se realizó un lavado de 10 min y 3 lavados de 5 min con TBS 1X + Tween20 y un lavado de 5 min con TBS 1X. La membrana se reveló con el Sustrato ECL (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA). El sustrato se preparó con una solución 1:1 luminol-peróxido (Figura 3).

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
Anti-Mtb	Instituto Politécnico Nacional	1:1000	Anti-Rabbit	Invitrogen, España	1:10000
Anti-CD63	Abcam, England	1:1000	Anti-Rabbit	Invitrogen, España	1:20000
Anti-CD81		1:1000	Anti-Rabbit	Invitrogen, España	1:20000
Anti-Ag85b	Abcam, England	1:5000	Anti-Rabbit	Invitrogen, España	1:10000
Anti-ESAT6	Abcam, England	1:2000	Anti-Mouse	Bio-Rad Laboratories, Inc, USA	1:4000
Anti-MPT64	CUSABIO, España	1:2500	Anti-Rabbit	Invitrogen, España	1:10000



**Figura 3.** Metodología de Western blot. 1. Extracción de proteínas: Consiste en extraer las proteínas a partir de lisados celulares diluidos en buffer RIPA. 2. Cuantificación de proteínas del lisado celular por el método de Bradford. 3. SDS-PAGE: Consiste en la realización de un gel de poliacrilamida, el cual va a permitir la separación de proteínas. 4. Electroforesis: Permite la separación de las proteínas por tamaño y peso molecular. 5. Transferencia y revelado: Consiste en la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana PVDF. Luego para llevar a cabo la detección de cada proteína en específico se incuban con anticuerpos para detectar su presencia.

### Extracción de RNA de los exosomas.

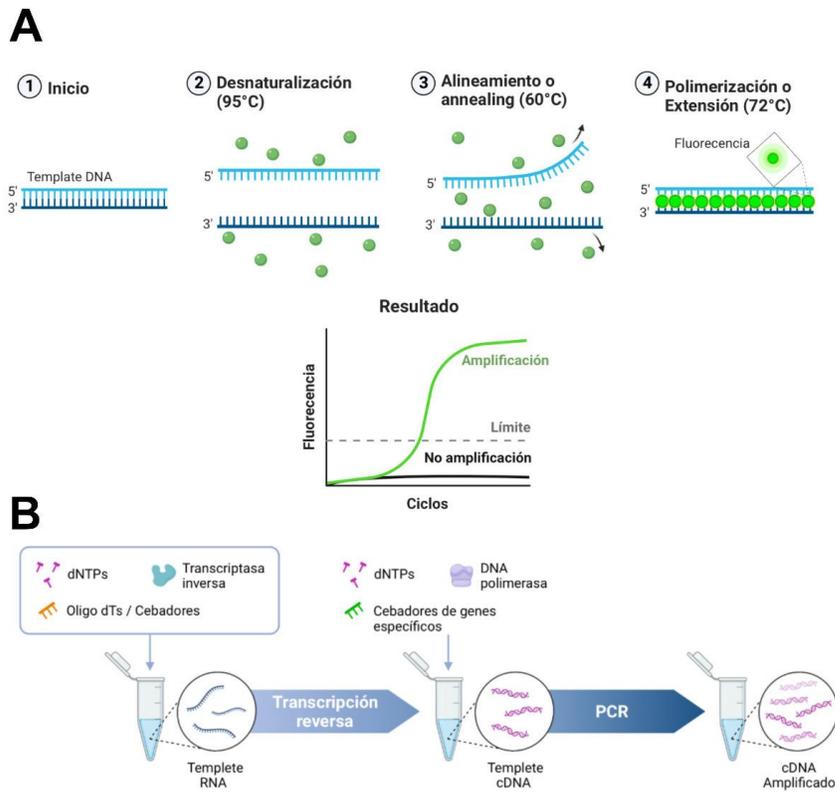
A partir de 100  $\mu$ l de los exosomas se realizó la extracción de RNA exosomal con el Kit Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit 4478545 (Thermo Fisher Scientific, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **Amplificación de 5KST, ESAT-6, CFP10, 19kDa, Ag85C y 30kDa de *M. tuberculosis*.**

El RNA extraído de los exosomas se utilizó para realizar cDNA. Se realizó la amplificación de secuencias de antígenos de *M. tuberculosis* (5KST, ESAT-6, CFP10, 19kDa, Ag85C y 30kDa, e IS6110), utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Amplicon-Clave	Oligos YGH-Secuencia 5'-3'	Tamaño	Autor
5KST-Nesh-Fw	TTGCTGAACTTGACCTGCCCCGTA	154	Nesh
5KST-Nesh-Rv	GCGTCTCTGCCTTCCTCCGAT		Nesh
ESAT-6-SG-FW	AAGCTCGCAGCGGCCTGG	135	SG
ESAT-6-SG-RV	CCTGACCGGCTTCGCTGA		SG
CFP10-SG-FW	AGGTAATTTTCGAGCGGAT	100	SG
CFP10-SG-RV	CACTGGCCCTGCAACGAA		SG
19KDA-SG-FW	GAGACCACGACCGCGGCAGG	161	SG
19KDA-SG-RV	AATGCCGGTCGCCGCCCGCCGAT		SG
AG85C-SG-FW	AAGGTCCAGTTCAGGGCG	139	SG
AG85C-SG-RV	ATTGGCCGCCACGGGCATGAT		SG
30KDA-RAJFBPB-FW	TGTACCAGTCGCTGTAGAAG	193	RAJ
30KDA--RAJ FBPB-RV	GACATCAAGGTTTCAGTTCC		RAJ

Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 3 min, y 30 ciclos de: desnaturalización: 95°C durante 30 s, alineación de primers: 53 para IS6110 y ESAT-6 y 54 para CFP10 durante 30 s, amplificación a 72°C por 45 s y una extensión final a 72°C por 5 min (Figura 4).



**Figura 4.** PCR. A. 1. Inicio 2. Desnaturalización: Se separa la doble hebra de DNA y convertirla en hebra sencilla. 3. Alineamiento: Primers se alinean con la hebra sencilla de DNA. 4. Polimerización o extensión: Se lleva a cabo la síntesis de la secuencia complementaria de las hebras de DNA molde. B. Se muestran los componentes utilizados en la realización de PCR punto final.

La siguiente tabla enlista características generales de las proteínas seleccionadas para este estudio, con el fin de tener información disponible para su consulta.

Proteína	Nombre oficial	Codigo UniProt	# de aminoácidos	Longitud	Masa (Da)	Gen	Codigo PDB
Ag85B	A85B_MYCTU	P9WQP1	325 aa	325	34,581	fbpB	1F0N
ESAT 6	ESXA_MYCTU	P9WNK7	95 aa	95	9,904	esA (esaT6)	3FAV
MPT64	MP64_MYCTU	P9WIN9	228 aa	228	24,855	mpt64	2HHI
MPB64	MP64_MYCBO	P0A5Q5	228 aa	228	24,855	mpb64	-
5KST	-	BioSample: Samn10319688	-	-	-	-	-
CFP10	MYCPF	A0A375YDU1	104 aa	104	10,825	MPP7335_01029	-
19kDa	LPQH_MYCTU	P9WK61	159 aa	159	15,147	lpqH	-
30kDa	A85B_MYCTA	A5U3Q3	325 aa	325	34,581	fbpB	-

## Análisis de resultados

Se realizó un análisis cualitativo para la expresión de proteínas y para la presencia de secuencias de RNA los datos se reportaron como ausencia o/o presencia.

## Resultados

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

En el grupo de pacientes con TB-MFR, se observó mayor frecuencia en el sexo masculino, la edad media fue de 42 años, y el rango de edades fue de 19 a 70 años. Se observó que la principal comorbilidad es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) con un 50%.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en las tablas 4 y 5, y el tratamiento estandarizado o individualizado de cada paciente se muestra en la tabla 1 de los anexos.

**Tabla 4.** Características demográficas de pacientes.

Características demográficas	n=18
	%
Variables	
<b>Sexo</b>	
Hombres	83.33
Mujeres	16.66
<b>Edad</b>	
<45 años	55.55
>45 años	44.44
<b>Procedencia</b>	
CDMX	33.33
Estado de México	27.77
Michoacán	11.11
Otros estados	27.77
<b>Comorbilidades</b>	
DM2	50.00
Alcoholismo	27.77
HAS	16.00
DNT	11.11
IRS	11.11
Otros	27.77
<b>Clasificación ultimo TX</b>	
Fracaso	61.00
Curación	27.77
Termino	5.50
S/D	5.50

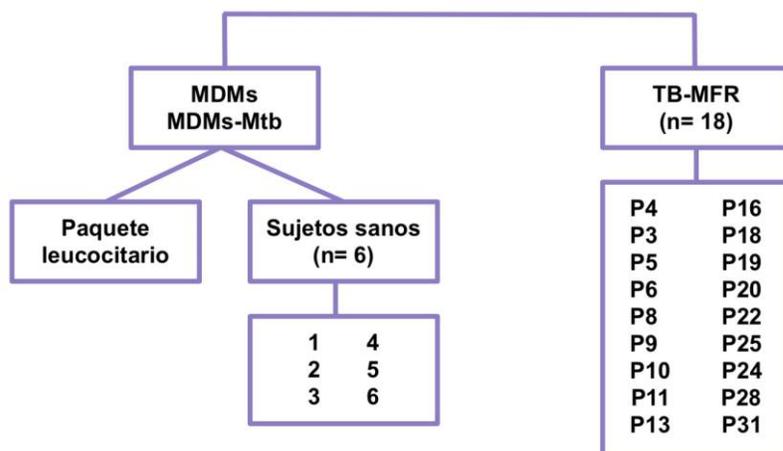
Abreviaturas: CDMX: ciudad de México, DM2: diabetes mellitus tipo 2, HAS: hipertensión arterial sistémica, DNT: desnutrición, IRS: insuficiencia renal crónica, S/D: sin datos. Otros (indigente, dislipidemia, linfoma de células T, micosis fungoide, tabaquismo y consumo de drogas).

**Tabla 5.** Características clínicas de pacientes.

Características clínicas	n= 18		
	Mediana	Rango	Valores normales
Variables			
Leucocitos	10.3	4.3-17.1	4.5- 11.00
Ntpor	74.2	39.3-85.5	40-85
NT	7.7	1.7-14.6	1.80-7.70
LINFOSpor	15.05	9.4-42.8	18-45
Linfocitos	1.4	1.2-2.5	1.00- 4.80
HB	14.35	6.9-17.5	H: 14-00-18.00 M: 12.00- 16.00
HTC	44.15	21.7-52.2	H: 42-52 M: 37-47
HbA1c	9.4	6.9-13.5	< 5.7
Glucosa	105.5	70-525	70- 110
Urea	25	12-52	< 40
BUN	11.5	6-24	7-18
Acido urico	5.7	2.48-8.31	3.0- 7.0
Cr	0.825	0.51-1.42	0.6- 1.2
ALB	3.67	2.06-4.56	3.5- 5.00
MDRD	101.5	50-151	> 90
CKD/EPI	100.5	56-133	61-115
DEP CR	109.015	35.59-209.24	H: 97-137
T SH	2.35	0.58-7.55	0.37- 4.7
T4L	1.205	0.93-1.6	0.9-2.3

Abreviaturas: Ntpor: Porcentaje de neutrofilos del total de leucocitos, NT: Total de neutrofilos del total de leucocitos, HB:Hemoglobina, HTC: Hematocrito, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, BUN: Nitrogeno ureico en la sangre, Cr: Creatinina, ALB: Albumina, MDRD: Modification of diet in renal disease, CKD/ EPI: Creatinina-cistatina (ecuación para estimar la GFR (tasa de filtracion modular)), DEP CR: Depuración de creatinina, T4L: Tiroxina, H: Hombre M: Mujeres, TSH: Tiroides

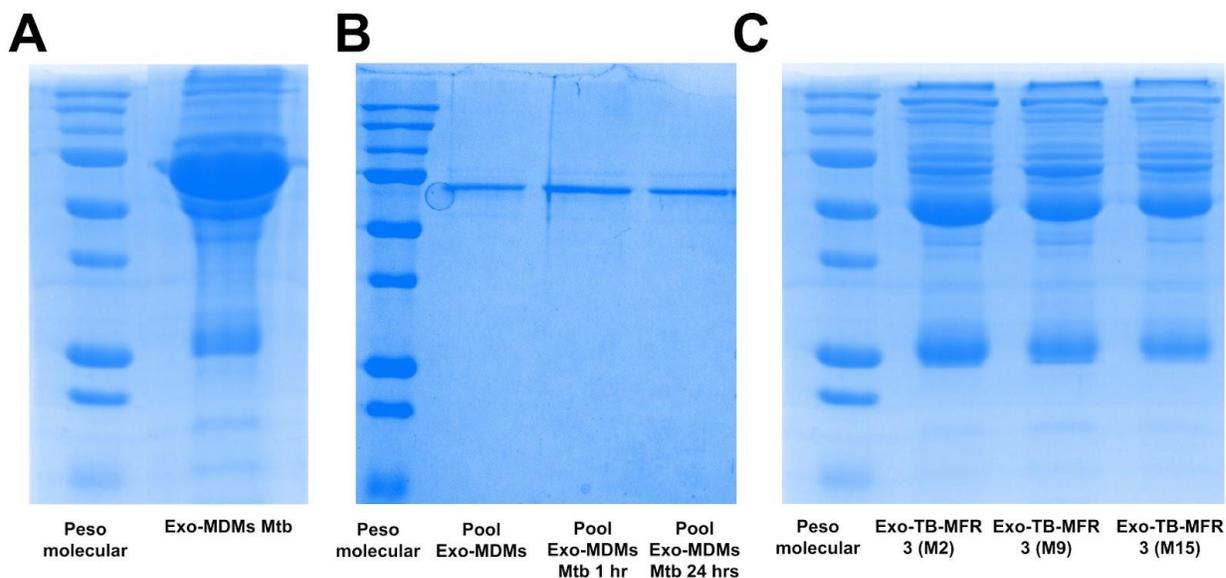
Las muestras se dividieron de manera general en dos, exosomas de MDMs y exosomas TB-MFR. Los exosomas de MDMs y MDMs-Mtb (MDMs infectados con *Mycobacterium tuberculosis*) provienen de sujetos sanos y de paquete leucocitario, por otro lado los exosomas TB-MFR provienen del suero de pacientes con TB-MFR. La figura 6 muestra un diagrama donde se observan los sujetos de estudio.



**Figura 6.** Sujetos de estudio. Se muestra un diagrama general de los sujetos de estudio, los sujetos sanos de los cuales se derivan los MDMs y MDMs-Mtb y los pacientes con TB-MFR.

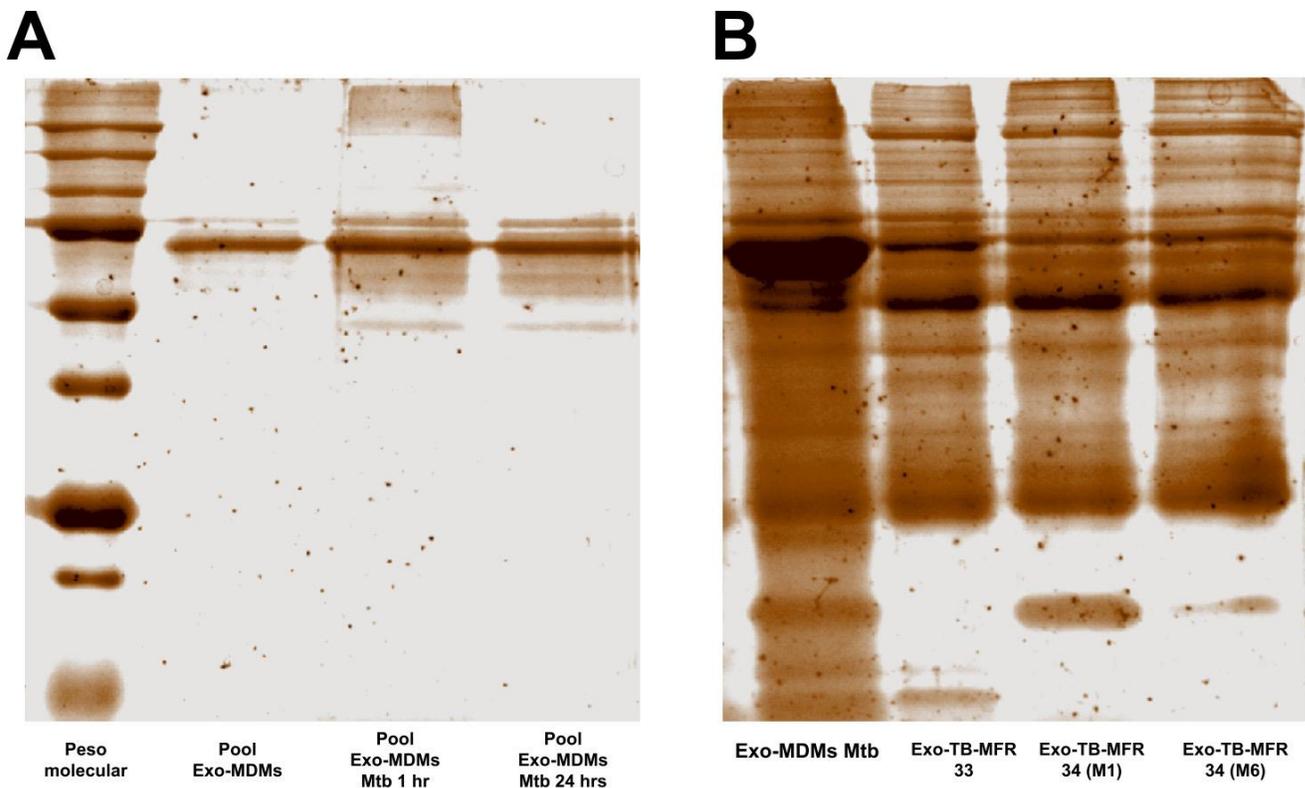
### **Presencia de proteínas en los exosomas de MDM-Mtb y exosomas de suero de pacientes con TB-MFR**

Se detectaron las proteínas totales presentes en los exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDM-Mtb obtenidos de sujetos sanos, de paquetes leucocitarios y de suero de pacientes con TB-MFR por tinción con Coomassie, como se muestra en la Figura 7|.



**Figura 7.** Proteína total de exomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDM-Mtb de paquete leucocitario, de sujetos sanos y de exomas de suero de pacientes con TB-MFR. Imagen representativa del gel teñido con Coomassie: **A)** Exo-MDMs Mtb (paquete leucocitario) (30 ug) durante 1h. **B)** Exo-MDM de pool de sujetos sanos (30ug), no infectados, infectados con Mtb 1h y 24h. **C)** Exo-TB-MFR extraídos de suero del paciente 3 (3ug) a M2: mes 2, M9: mes 9, M15: mes 15 de tratamiento.

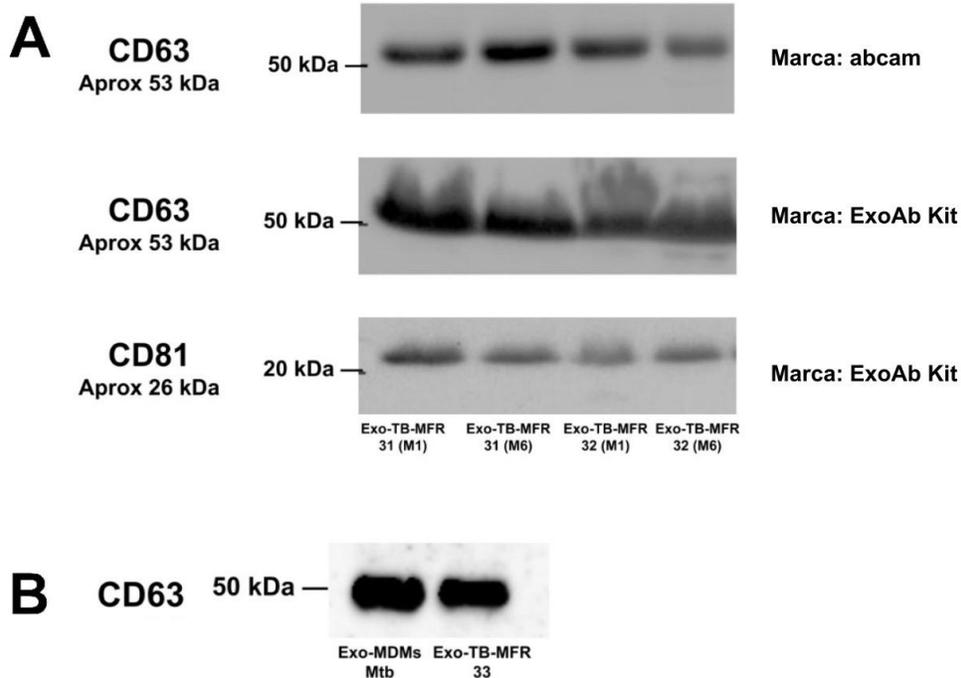
Para corroborar que en las muestras de los sujetos sanos contienen proteínas, se realizó la tinción de plata. Se incluyeron las mismas muestras de la figura 7 B, y como se muestra en la figura 8, las proteínas de mayor peso molecular se detectaron y las de bajo peso no se logran observar.



**Figura 8.** Proteína total de exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDM-Mtb de paquete leucocitario, de sujetos sanos y de exosomas de suero de pacientes con TB-MFR. Imagen representativa del gel teñido con plata: **A)** Exo-MDM de pool de sujetos sanos (30ug), no infectados, infectados con Mtb 1h y 24h. **B)** Exo-MDMs-Mtb (paquete leucocitario) durante 1 hora y Exo-TB-MFR extraídos de suero del paciente 33 (3ug) a M1: mes 1 y del paciente 34 (3ug) a M1: mes 1 y M6: mes 6 de tratamiento.

**Los exosomas aislados de MDM-M.tb y de pacientes con TB-MFR expresan la tetraspanina CD63.**

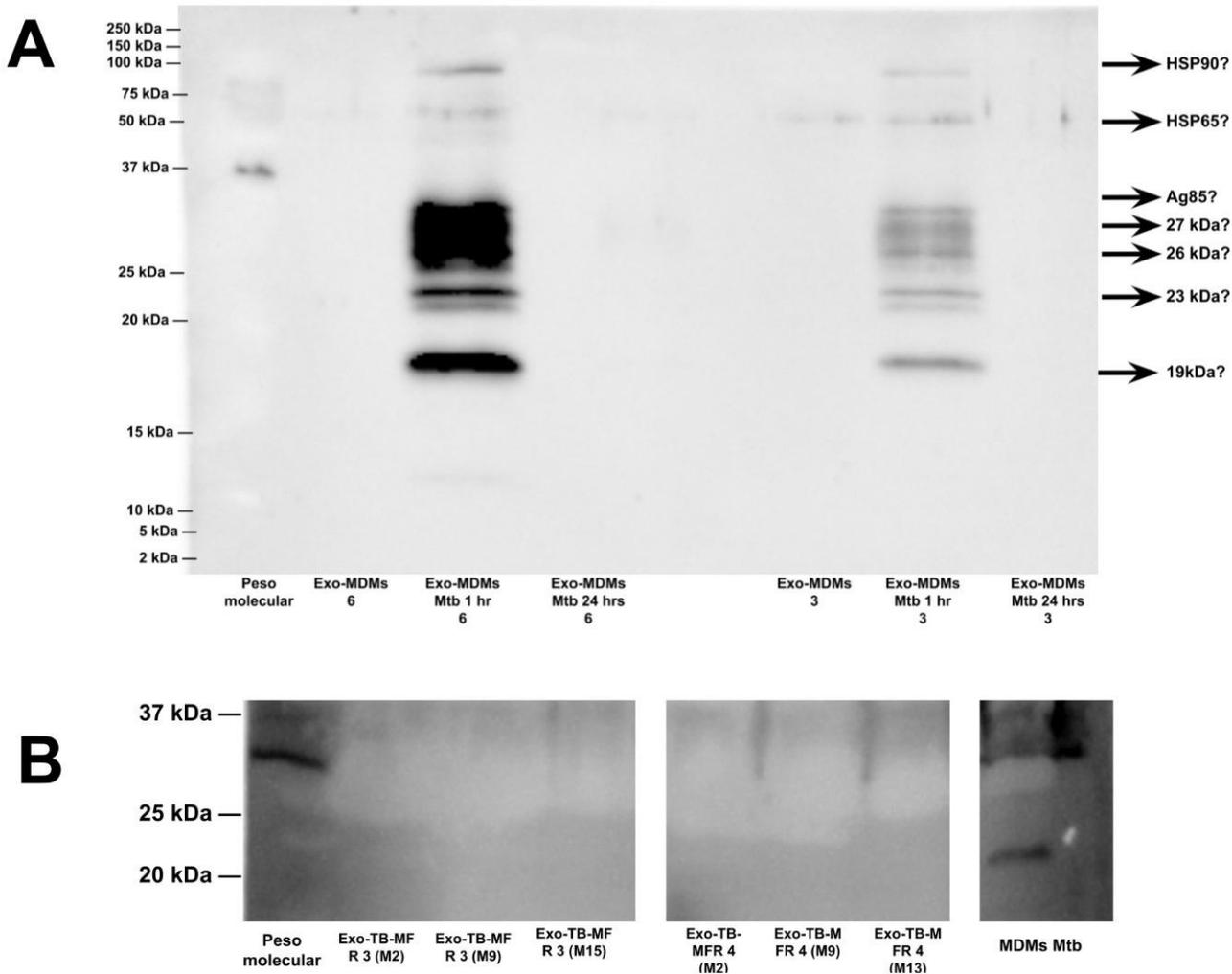
Para caracterizar los exosomas, se utilizó el kit ExoAb el cual detecta la presencia de las proteínas tetraspaninas CD63, CD81 y CD9, moléculas que distinguen a los exosomas de otras vesículas extracelulares pues son componentes típicos de ellas. Los exosomas de los pacientes con TB-MFR expresan las tetraspaninas CD63 y CD81, mientras los exosomas de los MDM-Mtb solo expresan la tetraspanina CD63 (Figura 8).



**Figura 9.** Caracterización de exosomas por expresión de tetraspaninas. **A)** Imagen representativa del Western blot en donde se muestra la expresión de CD63 con el anticuerpo marca abcam, el CD63 y CD81 del kit ExoAb Exo-TB-MFR extraídos del suero del paciente: 31 (3ug) a M1: mes 1 y M6: mes 6, y del paciente 32 (3ug) a M1: mes 1 y M6: mes 6. **B)** Expresión de CD63 en exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDM-Mtb (Exo-MDM-Mtb) y Exo-TB-MFR extraídos del suero del paciente: 33

### **Los exosomas generados por MDM-Mtb contienen proteínas de *M. tuberculosis*.**

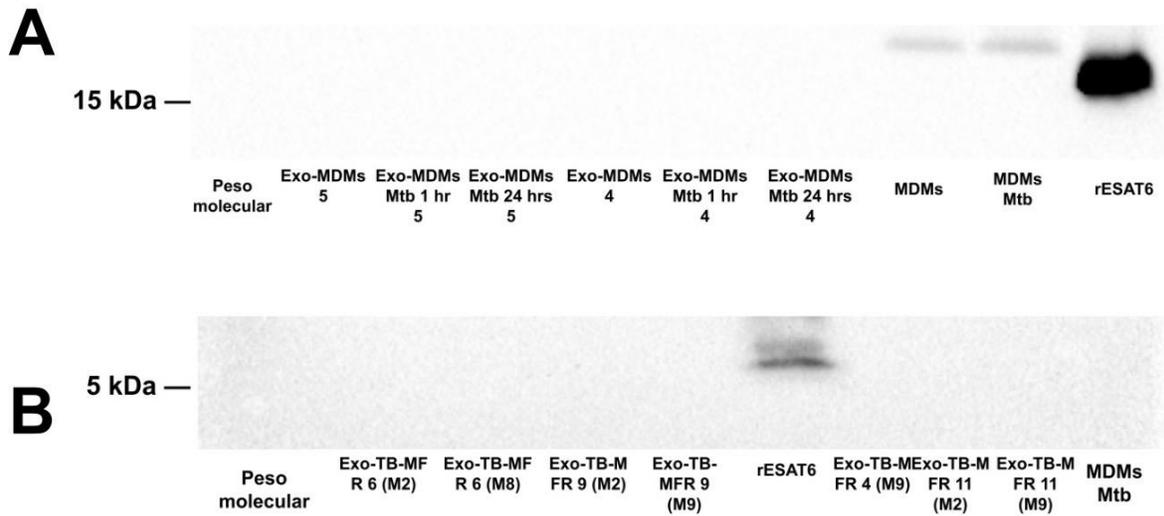
Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-Mtb generado en conejos infectados con *M. tuberculosis H37Rv* el cual fue proporcionado por la Dra. Iris Citlali Estrada García del departamento de inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. En la Figura 10A, se muestran los Exo-MDM a 1 y 24 h de infección con *M. tuberculosis*, se observa que el anticuerpo Anti-Mtb detecta diferentes proteínas a 1h de infección, se marcó con una flecha las proteínas que se especula podrían corresponder de acuerdo con el peso molecular. En la Figura 10B, se presentan los exosomas de pacientes con TB-MFR, el paciente P3 en los meses 2, 9 y 15, y el paciente P4 en los meses 2, 9 y 13; sin embargo, no se detectó ninguna proteína.



**Figura 10.** Identificación de proteínas de *M. tuberculosis* en exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDM-Mtb de sujetos sanos y en exosomas de sueros de pacientes con TB-MFR. Imagen representativa del ensayo de Western blot: **A)** Exo-MDM de sujetos sanos (6 y 3), no infectados, Exo-MDM Mtb 1h y 24 h. **B)** De izquierda a derecha, Exo-TB-MFR extraídos de suero del paciente 3 (3ug) a M2: mes 2, M9: mes 9, y M15: mes 15 y del paciente 4 a M2: mes 2, (6) M9: mes 9 y (7) M13: mes 13 y control de MDM-Mtb.

**Identificación de la proteína de *M. tuberculosis* ESAT 6 y del Ag85b en exosomas de MDM-Mtb en pacientes con TB-MFR.**

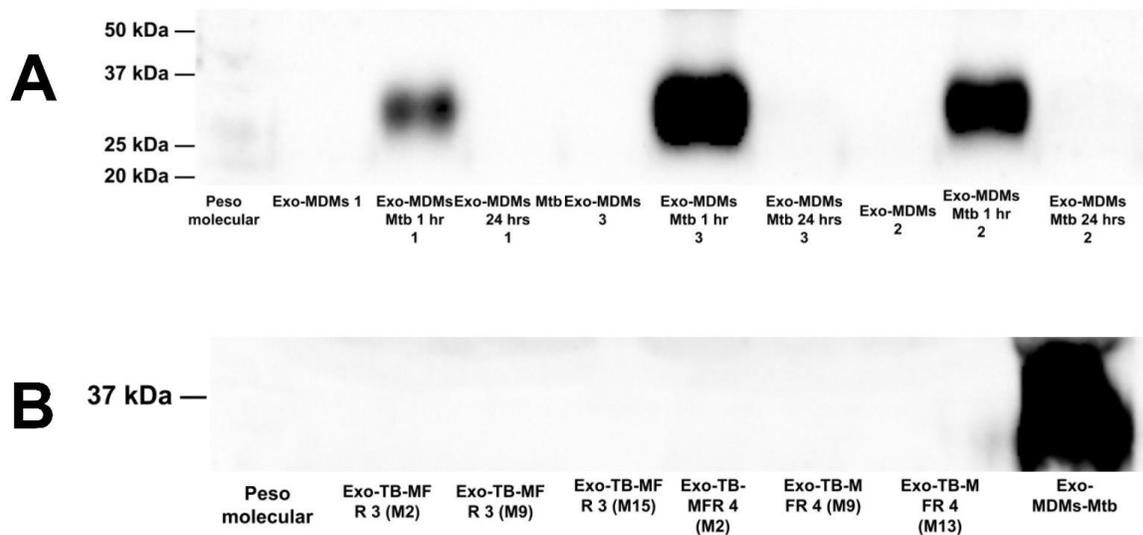
La proteína ESAT-6 no se detectó en ninguna muestra de Exo-MDM-Mtb o de los Exo-TB-MFR.



**Figura 12.**

ESAT 6 en exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDM-Mtb de sujetos sanos y paquete leucocitario, y de exosomas de suero de pacientes TB-MFR. Imagen representativa del ensayo de Western blot: **A**) Exo-MDM de sujetos sanos (5 y 4) no infectados, Exo-MDM-Mtb 1h y 24 h, y Exo-MDM (paquete leucocitario) no infectados e infectados con Mtb **B.** Exo-TB-MFR (3ug) de suero del paciente 6 a M2: mes 2 y M8: mes 8, del paciente 9 a M2: mes 2 y M9: mes 9, del paciente 4 a M9: mes 9 y del paciente 11 a M2: mes 2 y M9: mes 9.

La presencia del Ag85b a ~34kDa se detectó en los Exo-MDM-Mtb a 1h de infección (Figura 12 A). En cambio, en los pacientes con TB-MFR a diferentes tiempos de tratamiento, no se detectó ninguna proteína en los exosomas extraídos del suero de pacientes (Figura 12 B).

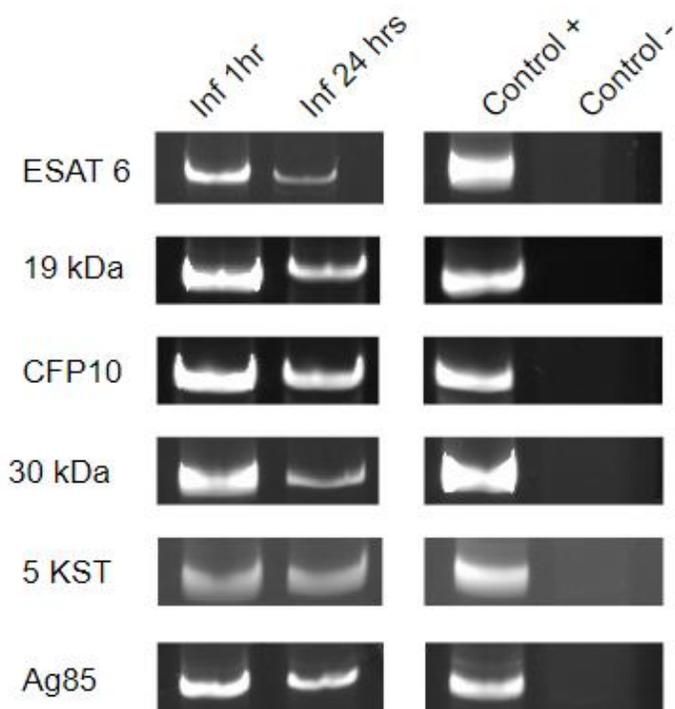


**Figura 12.** Ag85B en exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDM-Mtb de sujetos sanos. Imagen representativa del ensayo de Western blot **A**) Exo-MDM de tres sujetos sanos (1,3 y 2) sin infección, Exo-MDM-Mtb 1h y 24h. **B.** Exo-TB-MFR extraído de suero del paciente 3 a M2: mes 2, M9: mes 9, M15: mes 15 y del paciente 4 a M2: mes 2, M9: mes 9 y M13: mes 13 a 15  $\mu$ L, y de Exo-MDM-Mtb.

### Los exosomas Exo-MDM-Mtb y los Exo-TB-MFR contienen RNA de *M. tuberculosis*

La presencia de secuencias de RNA de *Mycobacterium tuberculosis*, para las secuencias ESAT-6, 19kDa, CFP10, 30kDa, 5KST y Ag85 se muestran en la figura 13.

La expresión de las secuencias ESAT-6, 19kDa, CFP10, 30kDa, 5KST y Ag85 de las muestras Exo- MDM-Mtb a la 1 y 24 h de infección se muestran en la tabla 6. La expresión de las secuencias ESAT-6, 19kDa, CFP10, 30kDa, 5KST y Ag85 ese detectaron en ambas condiciones de infección 1y 24 h.



**Figura 13.** Imagen representativa de PCR de las secuencias de *M. tuberculosis* en exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDMs infectados con *M. tuberculosis*H37Rv. Se observan 6 secuencias de RNA a dos diferentes tiempos (infectados 1hr e infectados 24hrs), así como los controles positivos y negativos.

**Tabla 6.** Presencia de secuencias provenientes de exosomas de MDM infectados con Mtb a 1 y 24h de infección.

<b>Resultado PCR</b>						
<b>Exo-MDMs-Mtb</b>	<b>30kDa (193 pb)</b>		<b>ESAT-6 (135 pb)</b>		<b>19kDa (161 pb)</b>	
	<b>1hr</b>	<b>24 hrs</b>	<b>1hr</b>	<b>24 hrs</b>	<b>1hr</b>	<b>24 hrs</b>
Exo-MDMs-Mtb- 1	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb- 2	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb- 3	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb- 4	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb- 5	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb- 6	+	+	+	+	+	+

<b>Exo-MDMs-Mtb</b>	<b>Ag85 (139 pb)</b>		<b>CFP10 (100 pb)</b>		<b>5KST (154 pb)</b>	
	<b>1hr</b>	<b>24 hrs</b>	<b>1hr</b>	<b>24 hrs</b>	<b>1hr</b>	<b>24 hrs</b>
Exo-MDMs-Mtb-1	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb-2	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb-3	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb-4	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb-5	+	+	+	+	+	+
Exo-MDMs-Mtb-6	+	+	+	+	+	+

Nota: En esta tabla se observa la expresión de las secuencias 30kDa, ESAT-6, 19kDa, Ag85, CFP10 y 5KST a 1 y 24 h de infección. Todas las secuencias de ambos tiempos se detectaron positivas.

En los Exo-TB-MFR se detectaron secuencias de RNA de los genes provenientes de 5KST y 30kDa. Los resultados de los pacientes a los diferentes meses de tratamiento se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Presencia de secuencias provenientes de exosomas obtenidos de suero de pacientes con TB-MFR en diferentes tiempos de tratamiento.

Exo-TB-MFR	Sin tratamiento		3-5 meses		6-8 meses		>9 meses	
	5KST	30kDa	5KST	30kDa	5KST	30kDa	5KST	30kDa
Exo-TB-MFR-1	-	-	-	-	-	-	-	+
Exo-TB-MFR-2	+	+	-	-	-	-	-	-
Exo-TB-MFR-3	+	-	-	-	+	+	ND	ND
Exo-TB-MFR-4	-	-	+	-	-	-	-	-
Exo-TB-MFR-5	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Exo-TB-MFR-6	+	+	-	-	-	-	+	+
Exo-TB-MFR-7	+	-	-	-	-	-	-	-
Exo-TB-MFR-8	+	+	-	-	-	-	-	-
Exo-TB-MFR-9	-	-	ND	ND	-	-	+	-
Exo-TB-MFR-10	-	-	-	-	-	-	-	-
Exo-TB-MFR-11	-	-	-	-	-	-	-	-
Exo-TB-MFR-12	-	-	ND	ND	-	-	-	-
Exo-TB-MFR-13	-	+	-	-	-	-	ND	ND
Exo-TB-MFR-14	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Exo-TB-MFR-15	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Exo-TB-MFR-16	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Exo-TB-MFR-17	-	-	+	-	-	-	ND	ND
Exo-TB-MFR-18	-	-	-	-	-	-	ND	ND

## Discusión

A lo largo de los años se ha observado un incremento de casos de enfermedades infecciosas, por lo que el tener un marcador para el diagnóstico de una enfermedad, así como poder llevar a cabo el seguimiento del tratamiento y el desenlace permitirá personalizar el tratamiento para mejorar la salud del paciente y puede prevenirse el aumento de la selección de cepas resistentes los fármacos disponibles.<sup>39</sup>

A pesar de que existe tratamiento contra la TB con eficacia del 85%, un mal diagnóstico, un deficiente esquema de tratamiento, la larga duración del tratamiento, los efectos adversos de los fármacos, pueden provocar el abandono del tratamiento.<sup>14,40</sup> La reciente pandemia de COVID19 afectó el control de la TB en México en cuanto a la reducción de la

enfermedad y la prestación de servicios, lo cual es un ejemplo de los diversos factores que pueden afectar la recuperación de una persona con TB. <sup>14,41</sup>

Aunque existen diferentes técnicas para el diagnóstico de la TB, aún no se ha encontrado un método adecuado que permita el seguimiento del tratamiento. Las técnicas existentes presentan problemas tales como el difícil acceso al pulmón y el hecho de que, después de tres meses de tratamiento, los pacientes ya no expectoran, de modo que es difícil evaluar la eficacia del tratamiento. En este trabajo se planteó una nueva estrategia de seguimiento del tratamiento farmacológico basada en la identificación tanto de proteínas y secuencias de RNA de *M. tuberculosis* en exosomas en un modelo de infección *in vitro* en macrófagos humanos como en exosomas extraídos del suero de pacientes con TB pulmonar multifarmacorresistente.

Utilizando anticuerpos policlonales anti-Mtb, se identificaron diferentes proteínas de *M. tuberculosis* en los exosomas de macrófagos infectados. Las proteínas detectadas en MDM de acuerdo a su peso molecular podrían ser: HSP90, HSP65, Ag85, 27kDa, 26kDa, 23 kDa y 19kDa. También se evaluaron con anticuerpos monoclonales proteínas específicas de *M. tuberculosis* como ESAT-6 y el Ag85B, identificando solo a la proteína de Ag85B; estos hallazgos concuerdan con lo reportado en un análisis de proteómica, en donde encontraron 41 proteínas micobacterianas, entre las proteínas identificadas se encontraron las proteínas ESAT-6, el complejo Ag85 (Rv3804c, Rv1886c, Rv0129c) y MPT64. En contraste, otros estudios solo encontraron 20 proteínas de *M. tuberculosis* en exosomas de pacientes con TB. Nosotros no detectamos ninguna proteína de *M. tuberculosis* en exosomas del suero de pacientes con TB-MFR. <sup>34,35,42-45</sup> La diferencia puede deberse a la sensibilidad del método

usado, ya que ellos emplearon espectrometría de masas con monitorización de reacciones múltiples (MRM-MS) y nosotros Western blot. Otra posible causa de que no encontramos proteínas de *M. tuberculosis* en los pacientes con TB es que la proteína no se encuentre completa, como se ha reportado en pacientes con tuberculosis, en dónde encontraron los péptidos del 85B, antígeno 85C, Apa, BfrB, GlcB, HspX, KatG, Mpt64, ESAT-6 Y CFP10 de *M. tuberculosis* por espectrometría de masas, o que la cantidad de proteínas micobacterianas podrían haber estado debajo de los límites de detección de la técnica de Western blot, tal como ha sido reportado.<sup>34, 46, 47</sup>

Por otro lado, se han identificado diferentes transcritos micobacterianos Rv3809c, Rv3533, Rv0243, Rv1101c y Rv2024c en exosomas liberados de macrófagos infectados, sugiriendo que la presencia de estos transcritos en las células del hospedero se generó después de la infección y su posterior incorporación en las vesículas. En este trabajo se encontró que los exosomas purificados de sobrenadante de cultivo de MDMs-Mtb contenían seis transcritos de *M. tuberculosis* ESAT 6, 19 kDa, CFP10, 30 kDa, 5KST y Ag85 a la hora después de la infección y se mantenían hasta 24h. Estos antígenos de *M. tuberculosis* se han sugerido como biomarcadores, ya que se ha reportado su presencia en a niveles elevados, por lo que podrían ser una alternativa para los problemas que tienen los métodos actuales.<sup>46, 48 49</sup>

A diferencia del análisis de proteínas micobacterianas que no se detectaron, los transcritos para la proteína de 30 kDa y de 5KST se encontraron en los exosomas de los pacientes con TB-MFR, siendo más frecuente el transcrito para 5KST antes del tratamiento. Estos resultados concuerdan con un estudio en el cual se identificaron por PCR Rv2796 y Rv1369c en los exosomas de suero de los individuos infectados por TB.<sup>48</sup> Por lo que este

estudio nos muestra que una alternativa eficaz para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de pacientes con TB-MFR podría ser la evaluación de la expresión del material genético de *M. tuberculosis*.

## Conclusión

Diferentes transcritos de *M. tuberculosis* se encuentran dentro de los exosomas liberados por macrófagos infectados *in vitro* con *M. tuberculosis* y en el suero de pacientes con TB-MFR activa, los cuales tienen el potencial de ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la TB pulmonar.

## Referencias

1. Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V. & Raviglione, M. C. Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country: WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA*. 1999 Aug 18;282(7):677–86. *J. Am. Med. Assoc.* **282**, 677–686 (1999).
2. Tasa de éxito en el tratamiento breve bajo observación directa de la tuberculosis. *Organización Mundial de la Salud*  
<http://mdgsunorg/unsd/mdg/SeriesDetail.aspx?srid=618> (2015).
3. Knight, G. M., McQuaid, C. F., Dodd, P. J. & Houben, R. M. G. J. Global burden of latent multidrug-resistant tuberculosis: trends and estimates based on mathematical modelling. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 903–912 (2019).
4. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, Walker AT, F. G. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* (2010).
5. World Health Organization. Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR TB) :2013 Update. *Online* 8–9 (2013).

6. CENAPRECE. Datos y Retos en Tuberculosis Fármacorresistente en México. (2014).
7. DELGADO ROSPIGLIOSI, J. L., SECLÉN SANTISTEBAN, S. N. & GOTUZZO HERENCIA, E. Tuberculosis en pacientes con diabetes mellitus: Un estudio epidemiológico y clínico en el Hospital Nacional Cayetano Heredia. *Rev. Medica Hered.* **17**, 132–140 (2006).
8. CENAPRECE. Asociación TB-Diabetes. México 2003-2012. [http://www.cenaprecesaludgobmx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reportaje\\_final\\_mexico.pdf](http://www.cenaprecesaludgobmx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reportaje_final_mexico.pdf) (2013).
9. CENAVECE. Retos y Desafíos en la Abordaje de la Tuberculosis Resistente en México. (2015).
10. Goletti, D., Petruccioli, E., Joosten, S. A. & Ottenhoff, T. H. M. Tuberculosis biomarkers: From diagnosis to protection. *Infect. Dis. Rep.* **8**, 24–32 (2016).
11. Secretaria de Salud. *Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de Casos Nuevos de Tuberculosis Pulmonar.* (2013).
12. Hough, K. P., Chanda, D., Duncan, S. R., Thannickal, V. J. & Deshane, J. S. Exosomes in immunoregulation of chronic lung diseases. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **72**, 534–544 (2017).
13. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (80- )*. **367**, (2020).
14. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2021.* (2021).
15. Ramirez-Lapausa, M., Menendez-Saldana, A. & Noguerado-Asensio, A. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *Am. Fam. Physician* **72**, 1761–1768 (2005).
16. (INSST), I. N. de S. y S. en el T. Mycobacterium Tuberculosis. *Fichas de Agentes Biológicos - DATABIO* 407–412 (2017) doi:10.7868/s0023476117030183.
17. Castellanos M, Salazar MA, Garcia M, Romero R, Avena A, E. A. Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos. *Gob. Fed. Mex.* **1**, 202 (2004).
18. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. & Stahl, D. A. *Brock. Biología de los microorganismos.* (Pearson Education, S.A., 2015).
19. UBA. Bacterias que no toman la coloración de Gram. **1**, 1–16 (2005).
20. I. Dorronsoro, L. T. Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* **30**, 67–

- 85 (2007).
21. González-martin, J. *et al.* Microbiología de la tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **15**, 25–33 (2016).
  22. (WHO), W. H. O. Tuberculosis. *World Health Organization* (2022).
  23. CENAPRECE. Tuberculosis. *Revista* vol. 0 1–2.
  24. CENAPRECE. Estándares para la atención de la tuberculosis en México. *Secr. Salud* 83 (2009).
  25. Sia, J. K. & Rengarajan, J. Immunology of mycobacterium tuberculosis infections. *Microbiol. Spectr.* **7**, 1056–1086 (2019).
  26. Barrios, M. T. H., Rojas, M. T., Carvajal, E. J. & Díaz, E. S. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* **18**, 327–336 (2005).
  27. Sreejit, G. *et al.* The ESAT-6 Protein of Mycobacterium tuberculosis Interacts with Beta-2-Microglobulin ( $\beta$ 2M) Affecting Antigen Presentation Function of Macrophage. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
  28. Jo, E. K., Yang, C. S., Choi, C. H. & Harding, C. V. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: Branching out from Toll-like receptors. *Cell. Microbiol.* **9**, 1087–1098 (2007).
  29. Maravillas-Montero, J. L. & Martínez-Cortés, I. Los exosomas de las células presentadoras de antígeno y su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas TT - Regulation of immune responses by exosomes derived from antigen presenting cells. *Rev. Alerg. México* **64**, 463–476 (2017).
  30. Abels, E. R., & Breakefield, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 301–312 (2016).
  31. Rojas-Valles, E. U., Sánchez-Godínez, J. Y., Bautista-González, A. I., Garduño-Torres, A. E. & González, Y. Exosomal biomarkers: new perspectives for the diagnosis and prognosis of respiratory diseases. *Neumol. y Cir. Torax(Mexico)* **80**, 269–285 (2021).
  32. Mehaffy, C., Dobos, K. M., Nahid, P. & Kruh-Garcia, N. A. Second generation multiple reaction monitoring assays for enhanced detection of ultra-low abundance Mycobacterium tuberculosis peptides in human serum. *Clin. Proteomics* **14**, 1–10 (2017).

33. Kruh-Garcia, N. A., Wolfe, L. M. & Dobos, K. M. Deciphering the role of exosomes in tuberculosis. *Tuberculosis* **95**, 26–30 (2015).
34. Kruh-Garcia, N. A. *et al.* Detection of Mycobacterium tuberculosis peptides in the exosomes of patients with active and latent M. tuberculosis infection using MRM-MS. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
35. Giri, P. K., Kruh, N. A., Dobos, K. M. & Schorey, J. S. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics* **10**, 3190–3202 (2010).
36. Urbanelli, L. *et al.* Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel)*. **4**, 152–170 (2013).
37. Zhang, J. *et al.* Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **13**, 17–24 (2015).
38. Lorente-Leal, V. *et al.* Validation of a real-time PCR for the detection of mycobacterium tuberculosis complex members in Bovine tissue samples. *Front. Vet. Sci.* **6**, 1–9 (2019).
39. Organización Mundial de la Salud (OMS). Pandemia por COVID-19 amenaza el control y eliminación enfermedades infecciosas en las Américas. <https://www.paho.org/es/noticias/11-8-2020-pandemia-por-covid-19-amenaza-control-eliminacion-enfermedades-infecciosas> (2020).
40. Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S. & Naidoo, K. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: A review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1138–1151 (2018).
41. Héctor, C. : *et al.* Tuberculosis in Mexico in times of COVID-19: some reflections. *Enf Emerg* **20**, 160–165 (2021).
42. Rivera, N., Ramírez, B. & Pérez, A. Mycobacterium tuberculosis: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Rev. Médica la Univ. Veracruzana* **2**, 39–43 (2002).
43. Wiker, H. G. & Harboe, M. The antigen 85 complex: A major secretion product of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol. Rev.* **56**, 648–661 (1992).
44. Schmidt-Schultz, T. H. & Schultz, M. AG 85, a major secretion protein of Mycobacterium tuberculosis, can be identified in ancient bone. *Elsevier* **95**, S87–S92 (2015).
45. Bekmurzayeva, A., Sypabekova, M. & Kanayeva, D. Tuberculosis diagnosis using

immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Elsevier* **93**, 381–388 (2013).

46. Rodríguez-Hernández, E., Quintas-Granados, L. I., Flores-Villalva, S., Cantó-Alarcón, J. G. & Milián-Suazo, F. Application of antigenic biomarkers for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **21**, 856–870 (2020).
47. BIADGLEGNE, F. *et al.* Exosomes in serum-free cultures of THP-1 macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med. Rep.* **24**, 1–9 (2021).
48. Prachi Pratap Singh, Li Li, and J. S. S. Exosomal RNA from *Mycobacterium tuberculosis* infected cells is functional in recipient macrophages. *Traffic* **16**, 555–571 (2015).
49. Alipoor, S. D. *et al.* Serum exosomal miRNAs are associated with active pulmonary tuberculosis. *Dis. Markers* **2019**, (2019).

## Anexos

En la Tabla 1 se presentan el sexo de los pacientes, así como su edad, los años con la enfermedad, la diferencia de IMC a lo largo del tratamiento y los fármacos a los que el paciente es resistente.

**Tabla 1.** Características clínicas generales.

Características clínicas n=18										
código DIM	Sexo	Edad	Diagnóstico	Años con la enfermedad	IMC Inicio de TX	IMC Termino de TX	Diferencia de IMC	Diferencia de IMC	Resistencia a fármacos	Tipo de tratamiento
P4	H	70	MFR	17 años	17.51	18.56	1.05	Desnutrición leve-Normal	E(5), H, R, Z	Estandarizado
P3	H	57	MFR	12 años	20.08	18.47	-1.61	Normal- Desnutrición leve*	E (b), H, R, Z, S, Pto	Individualizado
P5	H	49	MFR	11 años	19.35	Sin datos	Sin datos	Sin datos	E (5), H, R, S	Individualizado
P6	H	54	MFR	13 años	25.59	28.42	2.82	Sobrepeso	H, R	Estandarizado
P8	H	21	MFR	10 años	17.93	18.29	0.36	Desnutrición leve	H, R, Z, Pto	Estandarizado
P9	H	58	MFR	11 años	24.01	25.15	1.14	Normal- Sobrepeso	H, R	Individualizado
P10	M	19	MFR	11 años	17.71	21.5	3.79	Desnutrición leve-Normal	E(5), H, R, Z	Estandarizado
P11	M	33	MFR	13 años	18.49	20.55	2.05	Normal	H(0.1), R, Z, E, Pto	Individualizado
P13	M	61	MFR	15 años	28.95	30.26	1.32	Sobrepeso-Obesidad g.I	H, R	Estandarizado
P16	H	50	MFR	13 años	24.46	22.21	-2.26	Normal	H, R	Individualizado
P18	H	25	MFR	16 años	18.51	19.72	1.21	Normal	H, R	Estandarizado
P19	H	47	MFR	17 años	24.54	Sin datos	Sin datos	Sin datos	H, R, Z	Estandarizado
P20	H	26	MFR	20 años	19.88	Sin datos	Sin datos	Sin datos	H(0.1), R, Z	Estandarizado
P22	H	39	MFR	11 años	24.51	Sin datos	Sin datos	Sin datos	H, R, S	Estandarizado
P25	H	41	MFR	10 años	17.33	Sin datos	Sin datos	Sin datos	H, R, E, Pto, PAS	Individualizado
P24	H	42	MFR	12 años	17.19	Sin datos	Sin datos	Sin datos	H, R, PAS	Individualizado
P28	H	36	MFR	9 años	24.72	Sin datos	Sin datos	Sin datos	H,R	Estandarizado
P31	H	31	MFR	10 años	28.02	Sin datos	Sin datos	Sin datos	H, R,Z	Estandarizado

Posteriormente, en la Tabla 2 podemos observar los datos sobre el tratamiento de cada paciente, así como sus resultados de cultivo de la baciloscopía.

**Tabla 2.** Tratamiento y resultados de pacientes con TB-MFR.

Características clínicas		n=18						
código DIM	Tx Estandarizado/ Individualizado	Clasificación al último Tx	Fármacos	Número de fármacos	Mes del último dato	Cultivo	BK	Clasificación Tx después del tratamiento
P4	Estandarizado	Fracaso	Z, E, Ofx, Am, Pto, Cs	6	Mes 24	Negativo	0	Curación
P3	Individualizado	Fracaso	Z, Ofx, Am, Pto, Cs, PAS	6	Mes 25	Negativo	0	Curación
P5	Individualizado	Sin datos	Z, E, Lfx, Cm, Cs, PAS	6	Mes 10	Negativo	0	Transferencia
P6	Estandarizado	Curación	Z, E, Ofx, Cm, Pto, Cs	6	Mes 24	Negativo	0	Curación
P8	Estandarizado	Fracaso	Z, E, Ofx, Am, Pto, Cs	6	Mes 24	Negativo	0	Curación
P9	Individualizado	Fracaso	Z, E, Ofx, Am, Pto	5	Mes 18	Negativo	0	Curación
P10	Estandarizado	Curación	Z, E, Ofx, Cm, Pto, Cs	6	Mes 24	Negativo	0	Curación
P11	Individualizado	Fracaso	H 900, Z, Lfx, Am, Pto, Cs, PAS	7	Mes 24	Positivo	0	Fracaso
P13	Estandarizado	Fracaso	Z, Lfx, Cm, Pto, Cs, PAS	6	Mes 24	Negativo	0	Curación
P16	Individualizado	Fracaso	Z, Lfx, Am, Pto, Cs	5	Mes 24	Negativo	0	Curación
P18	Estandarizado	Fracaso	Z, E, Lfx, Am, Pto, Cs	6	Mes 25	Negativo	0	Curación
P19	Estandarizado	Curación	Z, E, Lfx, Am, Pto, Cs	6	Mes 5	Negativo	0	Abandono
P20	Estandarizado	Termino	Z, E, Lfx, Am, Pto, Cs	6	Mes 13	Negativo	0	Transferencia
P22	Estandarizado	Fracaso	Z, E, Lfx, Am, Pto, Cs	6	Mes 12	Negativo	0	En Tx
P25	Individualizado	Fracaso	Z, Lfx, Am, Pto, Cs	5	Mes 6	Negativo	0	En Tx
P24	Individualizado	Curación	Z, Lfx, Am, Pto, Cs	5	Mes 5	Negativo	0	En Tx
P28	Estandarizado	Curación	Z, E, Lfx, Am, Pto, Cs	6	Mes 4	Negativo	0	En Tx
P31	Estandarizado	Fracaso	Z, E, Lfx, Cm, Pto, Cs	6	Mes 3	Contaminado	0	En Tx

Durante este periodo se realizaron 2 artículos de revisión los cuales fueron publicados en la Revista oficial de la Sociedad Mexicana de Neumología y Cirugía de Tórax.

**NCT**

Neumología y Cirugía de Tórax

Vol. 80 - Núm. 4 / Octubre-Diciembre 2021

Revisión

doi: 10.35366/103452



## **Biomarcadores exosomales: nuevas perspectivas para el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades respiratorias**

**Exosomal biomarkers: new perspectives for the diagnosis and prognosis of respiratory diseases**

Edwin U. Rojas-Valles,<sup>\*,†,§</sup> J. Yureri Sánchez-Godínez,<sup>\*,†,§</sup> A. Ixchel Bautista-González,<sup>\*,†</sup>  
Ana E. Garduño-Torres,<sup>\*,†</sup> Yolanda González\*

\*Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México; †Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; §Los autores contribuyeron de igual manera en esta revisión.

**NCT**

Neumología y Cirugía de Tórax

Vol. 80 - Núm. 4 / Octubre-Diciembre 2021

Revisión

doi: 10.35366/103451



## **Fármacos de reposicionamiento y fármacos específicos en fase preclínica para la COVID-19**

**Repositioning drugs and specific drugs in preclinical phase for COVID-19**

Carlos Francisco Cabrera-Sánchez,\* J. Yureri Sánchez-Godínez,<sup>†,§</sup> Yolanda González<sup>§</sup>

\*Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México; †Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; §Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México.