



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Frecuencia de células T que secretan
interferón gamma como marcador de
respuesta a tratamiento en pacientes con
tuberculosis multifármaco-resistente**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MOISÉS ABIRAM VEGA POPOTLA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
2013**



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.

Agradecimientos

A mi madre, por todo el cariño, confianza, consejos y apoyo brindado durante mi desarrollo como persona.

A mi padre, por darme siempre un consejo reconfortante y por enseñarme a alcanzar mis metas.

A mis hermanos, por enseñarme de sus experiencias y siempre estar a mi lado.

A Maye, por estar conmigo en esta etapa tan importante de mi vida y apoyarme siempre que lo necesité.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias (Kelis, Pablo, Getse, Eloy, Chavela, Paty, Gustavo, Héctor, Caori, Carolina, Xóchitl, Annie, Hugo, Cristina, Karla, Maritza, Diana, Raúl y a todos los que estuvieron a mi lado), sin ustedes este camino no hubiera sido tan divertido.

A mis compañeros del INER (Fer, Ricardo, Madeline, Marychuy, Nané y Janeth), quienes hicieron de mi estancia en el instituto una experiencia divertida de aprendizaje.

A los profesores del INER (Dra. Martha, Dra. Tere, Dra. Esmeralda, Dra. Silvia, Dra. Karen, M. en C. Claudia y a la Dra. Marcela) quienes compartieron sus experiencias, anécdotas y conocimientos.

A Rosita y Luz, quienes me ayudaron siempre que lo necesité en el laboratorio.

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

Abreviaturas

BCG	Bacillus de Calmette y Guérin
BK	Baciloscopía
CFP-10	Proteína de Filtrado de Cultivo de 10 kDa
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ELISpot	Ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas
ESAT-6	Objetivo antigénico se secreción temprana de 6 kDa
IFN-γ	Interferón gama
IGRA	Ensayos de liberación de Interferón gama
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PHA	Fitohemaglutinina
PPD	Derivado Protéico Purificado
RD-1	Región de Diferenciación 1
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TB-XDR	Tuberculosis Extensivamente Resistente
TB-MFR	Tuberculosis Multifármaco-resistente
TST	Prueba de tuberculina para piel
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UFS	Unidades Formadoras de puntos

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Epidemiología de la Tuberculosis.....	2
Etiología.....	3
Síntomas Clínicos.....	3
Diagnóstico.....	4
Tratamiento.....	5
Tuberculosis MFR.....	6
Resistencia a fármacos.....	7
Epidemiología de TB-MFR.....	7
Diagnóstico de TB-MFR.....	10
Tratamiento de TB-MFR.....	10
Respuesta Inmune hacia <i>M. tuberculosis</i>	11
Células mediadoras de la respuesta inmune.....	12
Linfocitos T CD4 ⁺	12
Linfocitos T CD8 ⁺	13
Reconocimiento de antígenos microbacterianos en el contexto CD1.....	13
Citocinas mediadoras de la respuesta inmune.....	14
Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).....	14
Interferón gamma (IFN- γ).....	15
Principales antígenos del complejo de <i>M. tuberculosis</i>	16
Early Secretory Antigenic Target-6 (ESAT-6) y Culture Filtrate Protein (CFP-10).....	16
Derivado Proteico Purificado (PPD).....	16
Técnicas de inmunodiagnóstico y evaluación de eficacia al tratamiento.....	17
Enzyme-Linked InmunoSorbent SPOT (ELISPOT).....	17
Justificación.....	19
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	21

Métodos.....	21
Grupo de Estudio.....	21
Muestras Biológicas.....	22
Separación de Células Mononucleares.....	22
Congelamiento de Células.....	23
Descongelamiento de Células.....	23
Técnica de ELISPOT – IFN- γ	24
Análisis de Datos.....	25
Resultados.....	26
Grupos de Estudio.....	26
Muestras biológicas obtenidas durante el tratamiento.....	27
Frecuencia de Células productoras de IFN- γ como respuesta al tratamiento.....	29
en pacientes con TB-MFR	
Frecuencia de Células productoras de IFN- γ como respuesta al tratamiento.....	31
en cada paciente con TB-MFR	
Correlación de la Frecuencia de Células productoras de IFN- γ con el tiempo.....	37
de negativización del cultivo de <i>M. tuberculosis</i> .	
Discusión.....	38
Conclusiones.....	41
Referencias.....	42
Anexos.....	46

Resumen

La tuberculosis (TB) continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, y esta situación se agrava con la aparición de cepas resistentes a los fármacos, dando lugar a la tuberculosis multi-fármaco resistente (TB-MFR), la cual se caracteriza por la resistencia a la isoniazida y rifampicina. El tratamiento de la tuberculosis es largo y se requiere de pruebas o técnicas que permitan determinar la eficacia del tratamiento de forma oportuna. Los métodos disponibles para evaluar la eficacia del tratamiento se basan en el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), sin embargo su uso resulta difícil en el seguimiento del tratamiento ya que la carga bacteriana y el esputo disminuyen después de los primeros meses de tratamiento. Por tal motivo, se requiere desarrollar nuevos métodos de monitoreo del tratamiento. En el presente trabajo se evaluó la frecuencia de las células productoras de IFN- γ específicas a los antígenos micobacterianos ESAT-6, CFP-10 y PPD mediante la técnica de ELISPOT en células de sangre periférica de pacientes con TB-MFR. Dentro del periodo del 2010 al 2011 fueron incluidos 18 pacientes con TB-MFR con un esquema de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), de los cuales un paciente falleció durante el seguimiento, 9 abandonaron el estudio, 2 abandonaron el tratamiento y 6 terminaron el tratamiento. El presente estudio se enfocó a los 6 pacientes que terminaron el tratamiento. Las muestras de sangre periférica y de expectoración se obtuvieron al inicio y a los 1, 3, 6, 12, 18 y 22 meses del tratamiento farmacológico. Los cultivos de esputo de estos pacientes fueron negativos en 5 de los 6 pacientes a los 3 meses, mientras que en uno fue negativo al mes del tratamiento. La frecuencia de células productoras de IFN- γ en respuesta a los antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 y PPD) en pacientes con TB-MFR fueron positivos al inicio del tratamiento, durante y al finalizar el tratamiento lo que limita el uso de este ensayo en el seguimiento de la eficacia del tratamiento anti-tuberculosis en pacientes con TB-MFR. Este es el primer estudio donde se evalúa la respuesta de células T específicas a los antígenos de *M. tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 y PPD donde encontramos que las células T productoras de IFN- γ específicas se encuentran elevadas al momento del diagnóstico y esta frecuencia persiste a pesar del término del tratamiento y el diagnóstico de curación.

Introducción

Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica de incidencia (número de casos nuevos) creciente a nivel mundial y representa un severo problema de salud pública. Las últimas estimaciones a nivel mundial (2011) calculan una incidencia de 8.7 millones de casos con una prevalencia (número de casos existentes) de 12 millones de casos y una mortalidad de cerca de 1.4 millones. **(1)**

La infección se adquiere habitualmente por vía aérea, especialmente mediante las gotitas de Flügge que son proyectadas al toser por personas infectadas con *M. tuberculosis*. Por tanto, el contagio se realiza de persona a persona y por inhalación de polvo desecado del esputo tuberculoso, es más frecuente en ambientes mal ventilados y en personas que conviven con pacientes con TB **(2)**. El reservorio lo constituyen las personas enfermas con la infección y en ocasiones pueden mostrar síntomas o no. Se calcula que cada persona tuberculosa contagia a 2-3 personas al año, pudiendo llegar hasta 10 **(3)**. En la mayoría de los casos de infección por *M. tuberculosis*, el individuo permanece asintomático y no infeccioso. Esta latencia clínica a menudo se extiende durante toda la vida del individuo. Con tratamiento efectivo, la TB es curable y deja de ser contagiosa aproximadamente en unas 4-6 semanas (el 100% de los casos a los 3 meses de tratamiento). **(4, 5)**

Sin embargo, no todas las personas que se infectan con *M.tuberculosis* desarrollan la enfermedad, el riesgo de desarrollarla esta influenciado por las condiciones higiénico-ambientales, por la estrechez y persistencia del contacto (cantidad de bacilos inhalados), por la edad (más frecuente en edades tempranas y avanzadas), y por la existencia de enfermedades que puedan deprimir la inmunidad como la diabetes mellitus, uremia, enfermedades infecciosas crónicas, sarampión, alcoholismo, SIDA, drogadicción y tratamientos con corticoides o inmunosupresores. **(6)**

Etiología

La TB es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Este es un bacilo ácido-alcohol resistente con tamaño de 0.2 a 0.6 X 1 a 10 µm, es aerobio estricto, inmóvil y no esporulado tiene una pared celular muy rica en lípidos, lo que causa que la superficie sea muy hidrofóbica y sea muy resistente a antisépticos. Su crecimiento está determinado por la presencia de oxígeno y al pH circundante, es resistente a las condiciones de frío, congelación y desecación. Su multiplicación es lenta ya que se divide cada 16 a 20 horas. Aunque la *M. tuberculosis* causa principalmente una enfermedad pulmonar, afecta también a otros órganos y tejidos. Ante circunstancias adversas como pH ácido, hipoxia o radicales tóxicos de oxígeno, la bacteria puede entrar en estado latente, y retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. El reservorio natural de *M. tuberculosis* es el ser humano. **(7, 8)**

Síntomas clínicos

Alrededor del 10% de los individuos infectados desarrollan la enfermedad activa en el transcurso de los dos primeros años posteriores a la infección. **(8)**

Cuando la TB se presenta, los síntomas (tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etc.) pueden ser leves por muchos meses. Como resultado, los pacientes tardan en buscar atención médica y transmiten la bacteria a otros. A lo largo de un año, cuando la enfermedad se desarrolla completamente en un individuo, se presenta tos persistente con liberación de una gran cantidad de bacilos y lesiones pulmonares que van desde granulomas hasta la formación de cavitaciones. Un enfermo tuberculoso puede infectar a unas 10 personas por contacto estrecho. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos con TB mueren a causa de hemoptisis (sangrado pulmonar). **(9)**

Diagnóstico

Las radiografías de tórax son el primer método de diagnóstico, pueden ser útiles para precisar la localización y extensión de las lesiones. A todo paciente con radiografía de tórax sugestiva de tuberculosis debe solicitarse tres baciloscopías. Sin embargo, las imágenes observadas en una radiografía torácica son inespecíficas, ya que pueden corresponder a otra patología como: neumonías por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, micosis invasoras, neoplasias, neumoconiosis, fibrosis quística, bronquiectasias, entre otras. **(10, 11)**

La prueba cutánea de reacción al PPD es hoy en día es la única prueba de piel disponible usada para conocer el contacto previo con micobacterias o en ciertos casos incluso es un indicador de infección activa; por ello, eventualmente el resultado de la prueba positiva a la tuberculina (TST, por sus siglas en inglés tuberculin skin test) puede ser interpretada como auxiliar en el diagnóstico de la TB o para la detección de la TB latente. Aunque la TST tiene una notable sensibilidad y ha sido usada durante cinco décadas para la identificación de personas infectadas con *M. tuberculosis*, tiene una baja especificidad para la TB cuando es comparada con otras especies de micobacterias en el complejo de *M. tuberculosis*. Las reacciones cruzadas debido a la vacunación con BCG, una cepa atenuada de *M. bovis* o la exposición a, o infección con micobacterias ambientales (EM) también puede conducir a resultados de falsos positivos. **(30)**

El diagnóstico microbiológico de la TB se basa en baciloscopía del esputo (presencia de bacilos teñidos por la técnica de Ziehl-Nielsen observados por microscopía) y el cultivo. En la baciloscopía se identifica a los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en múltiples muestras biológicas, como en esputo. Es sencilla, rápida, de bajo costo y amplia cobertura. Su inconveniente radica en limitaciones de sensibilidad (77.2%) y especificidad (99.7%). Se requieren 5.000 a 10.000 bacilos por mL de expectoración para que sea positiva **(12)**. Se informa el resultado graduado en 1 a 4 cruces (+ a ++++). Para este examen se requiere de la primera muestra de esputo de la mañana y de buena calidad. Un examen positivo

permite establecer el diagnóstico de TB pulmonar. Si el paciente es incapaz de producir esputo es posible inducirlo con nebulización de NaCl hipertónico (3-5%) en una sala con presión negativa. Esto debiera preceder a técnicas más invasivas como la broncoscopia (útil en individuos que no expectoran con cuadro clínico-radiográfico sugerente de TB) donde se examina bajo el microscopio las muestras de esputo para ver si contienen bacilos tuberculosos. **(10)**

El cultivo de *M. tuberculosis* es el método considerado como el estándar de oro. Previo al cultivo la muestra debe sufrir un proceso de homogenización, para liberar los bacilos del moco, material celular o tejido donde se encuentre incluido, descontaminación para eliminar la flora colonizante y concentración de los bacilos presentes en la muestra. **(10)**

Su principal inconveniente es el lento crecimiento de *M. tuberculosis*, ya que habitualmente requiere de 30 días de espera. Es un procedimiento de mayor complejidad y más caro que la baciloscopia, y requiere de 500 a 1.000 bacilos por mililitro (mL) de expectoración para ser positivo **(9)**.

Tratamiento

El tratamiento contra la TB se basa en el programa de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES). Este programa tiene un éxito variable; reportes del 2009 muestran una eficacia del 86% en pacientes con baciloscopías positivas, y del 61% en casos de re-tratamiento **(13)**.

La TB es una enfermedad que se puede tratar y curar, es causada por una cepa de *M. tuberculosis* sensible a los antibióticos y se trata con una combinación estándar de cuatro medicamentos (Tabla 1) administrados durante seis meses junto con información, supervisión y apoyo del paciente por un médico o un voluntario capacitado. El tratamiento de la TB es largo y requiere de la combinación de fármacos para evitar la fármaco resistencia y por lo cual la monoterapia no es recomendada. Si no se proporciona supervisión y apoyo, la eliminación total de los bacilos puede ser difícil y, como

consecuencia, la infección puede propagarse. La gran mayoría de los enfermos pueden curarse con la condición de que los medicamentos se tomen correctamente. **(9)**

El tratamiento de la TB requiere un mínimo de 6 meses de una terapia combinada con fármacos que tienen diversos efectos adversos como son la intolerancia gastrointestinal, la nefrotoxicidad y la pobre adherencia al tratamiento ha conducido al incremento de cepas fármaco-resistentes. **(4)**

Uno de los factores que limitan el éxito del tratamiento es que no se cuenta con un marcador clínico, bacteriológico o serológico realmente útil para monitorear la respuesta al tratamiento de la TB, en pacientes con TB y TB-MFR (Tuberculosis multi-fármaco resistente). **(13)**

Tabla 1. Dosis recomendada para el tratamiento de TB con medicamentos de primera línea. Modificada de Treatment of tuberculosis guidelines. **(10)**

Dosis Recomendadas para Adultos de Medicamentos Anti-tuberculosis de Primera Línea				
Medicamento	Dosis Recomendada			
	Diaria		3 veces por semana	
	Dosis y rango (mg/Kg peso corporal)	Máximo (mg)	Dosis y rango (mg/Kg peso corporal)	Máximo (mg)
Isoniazida	5 (4-6)	300	10 (8-12)	900
Rifampicina	10 (8-12)	600	10 (8-12)	600
Pirazinamida	25 (20-30)	-	35 (30-40)	-
Etambutol	15 (15-20)	-	30 (25-35)	-
Estreptomina	15 (12-18)		15 (12-18)	1000

Tuberculosis Multi-fármaco resistente (TB-MFR)

La TB-MFR es una forma específica de TB. Se manifiesta cuando las micobacterias causantes de la TB son resistentes por lo menos a la isoniazida y a la rifampicina, los dos medicamentos anti-tuberculosis más potentes.

Resistencia a fármacos

Se han encontrado cepas de *M. tuberculosis* resistentes a por lo menos un medicamento anti-tuberculosis a nivel mundial **(9)**. El mecanismo de aparición de la resistencia es independiente de la exposición de la bacteria a los medicamentos contra *M. tuberculosis*, la resistencia primaria se origina por mutación espontánea de las bacterias después del crecimiento bacteriano a las siguientes concentraciones: ISONIAZIDA (INH) 1×10^6 bacilos, RIFAMPICINA (RFP) 1×10^8 bacilos, ESTREPTOMICINA 1×10^7 bacilos, PYRAZINAMIDA 1×10^6 bacilos, ETHAMBUTOL 1×10^5 bacilos, INH - RFP 1×10^{14} bacilos. Existe otra forma de resistencia conocida como secundaria en donde se seleccionan estas cepas resistentes por: prescripción de esquemas de tratamiento inadecuados, no seguir régimen recomendado, Intolerancia a drogas o suspensión prematura del tratamiento. **(9)**

La enfermedad causada por bacilos resistentes a la isoniazida y rifampicina no responde al tratamiento de primera línea. No obstante, la forma multi-fármaco resistente se puede tratar y curar con medicamentos de segunda línea (Tabla 2). Aun así, hay pocas opciones y, además, los medicamentos recomendados no siempre se consiguen. El tratamiento prolongado necesario (hasta dos años de tratamiento) es más caro y puede producir reacciones adversas graves. **(9)**

En algunos casos la farmacoresistencia puede extenderse dando origen a cepas extensivamente resistentes conocidas como tuberculosis extensivamente fármaco-resistente (TB-XFR), que solo responde a unos pocos medicamentos anti-tuberculosis de segunda línea. **(13)**

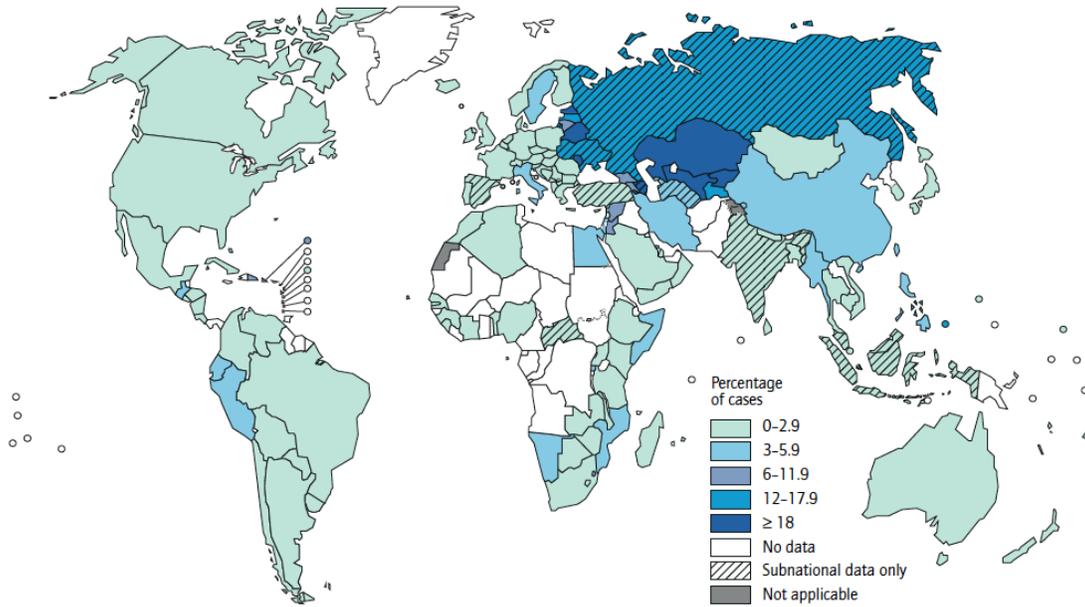
Epidemiología de TB-MFR

En 2010 fueron estimados 650,000 casos de TB-MFR en el mundo **(14)** y en el 2011 de 630,000 casos de TB-MFR (en un rango de 460,000–790,000) entre los 12 millones de casos de prevalencia mundial. **(1)** Se calcula a nivel mundial que el 3.7% (2.1-5.2%) de

nuevos casos y 20% (13-26%) de los casos previamente tratados tienen TB-MFR. Los niveles de TB- MFR son preocupantemente altos en algunas partes del mundo, sobre todo en países del noreste de Europa y Asia central. En muchos de estos países entre el 9 y el 32% de los nuevos casos son TB-MFR (figura 1) y mas del 50 % de los casos con tratamiento previo son TB-MFR (figura 2). **(1)**

Tabla 2. Grupos de medicamentos para el tratamiento de la TB-MFR, agrupados de acuerdo a su eficacia, experiencia de uso y clase de medicamento. Modificada de Treatment of tuberculosis guidelines. **(10)**

Grupos de Medicamentos para el Tratamiento de TB-MFR	
Grupo 1 Agentes orales de primera línea	<ul style="list-style-type: none"> • Medicamento (abreviaturas) • Pirazinamida (Z) • Etambutol (E) • Rifabutina (Rfb)
Grupo 2 Agentes inyectables	<ul style="list-style-type: none"> • Kanamicina (Km) • Amikacina (Am) • Capreomicina (Cm) • Estreptomicina (S)
Grupo 3 Fluoroquinolonas	<ul style="list-style-type: none"> • Levofloxacino (Lfx) • Moxifloxacino (Mfx) • Ofloxacino (Ofx)
Grupo 4 Agentes orales bacteriostáticos de segunda línea	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido para-aminosalicílico (PAS) • Cicloserina (Cs) • Tirezidona (Trd) • Etionamida (Eto) • Protionamida (Pto)
Grupo 5 Agentes sin un rol particular en el tratamiento con TB-MFR	<ul style="list-style-type: none"> • Clofazimina (Cfz) • Linezolid (Lzd) • Amoxicilina/Clavulanato (Amx/Clv) • Tiacetazona (Thz) • Imipenem/cilastatina (Ipm/Cln) • Dosis alta de isoniazida (dosis alta H) • Claritromicina (Clr)



^a Figures are based on the most recent year for which data have been reported, which varies among countries.

Figura 1. Porcentaje de casos nuevos de TB-MFR a nivel mundial. *Tomada de Treatment of tuberculosis guidelines. (10)

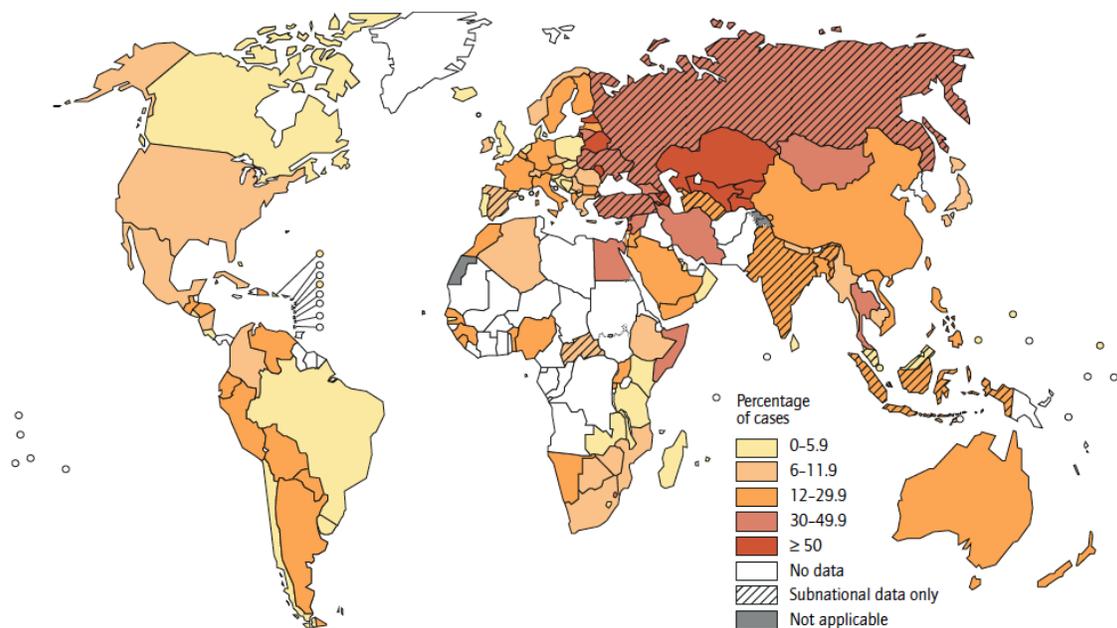


Figura 2. Porcentaje de casos con TB-MFR tratados previamente para TB. *Tomada de Treatment of tuberculosis guidelines. (10)

Diagnóstico de TB-MFR

El diagnóstico de la TB-MFR es complejo. La determinación de la multirresistencia se hace por varias técnicas. La primera de esas técnicas consiste en medir la proporción de bacilos resistentes que existen en una cepa. La segunda es el método de proporción en placas, se compara el número de colonias que crecen en un medio que contiene medicamentos con el número que crece en un medio sin medicamentos. Por otro lado, también existe un Método Radiométrico más tecnificado (Bactec 460 TB): esta técnica mide cuantitativamente el $^{14}\text{CO}_2$ producido durante el metabolismo del sustrato marcado con ^{14}C presente en el medio en una escala de 0 a 999. El método de Griess se basa en la determinación de la actividad de reducción de nitrato en el cultivo de *M. tuberculosis* en medio sólido L-J (Löwestein-Jensen) conteniendo NaNO_3 (1 g/l) con y sin droga y por último el Xpert MTB/RIF, un ensayo de amplificación nucleica basado en cartuchos automatizados para la detección simultánea de la tuberculosis y la resistencia a rifampicina directamente del esputo en menos de dos horas. La OMS recomienda el uso de la tecnología y está monitoreando el despliegue mundial de la tecnología para promover la coordinación. **(6, 9, 15)**

Tratamiento de TB-MFR

Actualmente el tratamiento estándar para la TB-MFR es de 18-24 meses siendo costoso y puede tener varios efectos adversos como son neuropatía, intolerancia gastrointestinal y nefrotoxicidad. Por ello se están probando clínicamente nuevos fármacos que puedan ser usados para tratar la TB fármaco sensible y la TB-MFR bajo un tratamiento de corta duración **(1)**. Por otra parte no hay una vacuna totalmente efectiva para prevenir la TB en adultos. El progreso en la década pasada refiere la posibilidad que al menos una nueva vacuna pueda ser registrada para el 2020. **(1)**

Respuesta inmune hacia *M. tuberculosis*

El desarrollo de la enfermedad solo se observa en el 10% de los individuos infectados debido a que el 90% de las personas infectadas inmunocompetentes son capaces de controlar la infección por medio de una respuesta inmune innata y adaptativa eficientes, sin embargo, la respuesta inmune controla pero no elimina al patógeno. **(6)** La falta de una respuesta inmune efectiva da como resultado el desarrollo a TB activa, sin embargo, la respuesta inmune en personas que no se enferman no elimina a la bacteria y esta se mantiene de manera latente, la cual es posible que se reactive en el momento en que la respuesta inmunológica se debilita. **(5, 6)**

El control de la infección por *M. tuberculosis* se lleva a cabo por los macrófagos alveolares los cuales son considerados la primera línea de defensa frente a la infección y participan en la muerte de *M. tuberculosis* y son al mismo tiempo el lugar donde la micobacteria logra sobrevivir. **(16)**

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por los cuales *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos, incluyen: la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, inhibición de la acidificación del fagosoma y además, *M. tuberculosis* es resistente a los mecanismos de destrucción mediados por los intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno. **(17, 18)**

Las micobacterias fagocitadas por los macrófagos alveolares que escapan a la lisis intracelular se multiplican e inducen una respuesta pro-inflamatoria localizada, asociada con la liberación de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 alfa (MCP-1 α) encargadas de atraer al sitio de infección a monocitos, células dendríticas, linfocitos, células NK, NKT y neutrófilos. Estas células que producen más citocinas y amplifican la respuesta inflamatoria, posteriormente serán las encargadas de formar el granuloma característico de la infección por *M. tuberculosis*. **(17)**

Aproximadamente de dos a tres semanas después de la infección se desarrolla la inmunidad adaptativa mediada por células T. Cuando la respuesta inmune es incapaz de destruir a *M. tuberculosis* pero si es capaz de controlar el avance de la enfermedad se forma un granuloma que contiene la infección dentro de una gruesa cápsula fibrótica formada por macrófagos, neutrófilos, macrófagos espumosos, células gigantes y un infiltrado linfocitario alrededor del mismo, el granuloma es una estructura altamente dinámica capaz de evitar la progresión de la infección a la enfermedad. **(19)**

Células mediadoras de la respuesta inmune

El éxito de la limitación de la infección por *M. tuberculosis* depende de la interacción de los macrófagos infectados y los linfocitos T. La respuesta adecuada de las células T depende sobre todo del reconocimiento de antígenos específicos, el cual se desarrolla principalmente, en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II.

Linfocitos T CD4⁺

Son células muy importantes para el desarrollo de la respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis*, como lo ha demostrado la actual pandemia del VIH donde la destrucción de estas células hace más susceptibles a estos pacientes al presentar una progresión más rápida de una infección por *M. tuberculosis* reciente a enfermedad activa o a la reactivación de una infección latente. **(20)**

Los linfocitos T CD4⁺ reconocen a antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas MHC II. Los antígenos micobacterianos inmunodominantes para las células T CD4⁺, incluyen la proteína de 30-32 KDa ESAT-6, CFP-10, lipoproteínas de 19 y 38 KDa y dos proteínas de 32 KDa (proteasa de serina) y 39 KDa. **(21)**

Se han descrito dos subgrupos de linfocitos T CD4⁺: las células Th1 productoras de citocinas pro-inflamatorias como el IFN- γ , TNF- α e IL-12; y las células Th2 productoras de IL-4, IL-5 e IL-13. En la infección con *M. tuberculosis* la respuesta Th1 es la más importante debido a que activa mecanismos efectores bactericidas de macrófagos infectados. **(22)**

Linfocitos T CD8⁺

Reconocen antígenos presentados en la superficie de las células en el contexto de moléculas del MHC clase I. Las células T CD8⁺ juegan un rol importante en la modulación de la respuesta porque dan balance a la respuesta por Tc1 y Tc2 a través de la secreción de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-4. Otro subtipo de células CD8⁺ se diferencian en células citolíticas (CTL) productoras de perforinas, granzimas y granulinas las cuales son capaces de lisar los macrófagos infectados. No se conoce del todo como los antígenos de *M. tuberculosis* tienen acceso a las moléculas de clase I, ya que *M. tuberculosis* es un microorganismo que reside dentro de la vacuola del macrófago, y para tener acceso al MHC clase I debe ser primero transportado al citoplasma. En la actualidad hay evidencia que el bacilo se encuentra fuera de las vacuolas después de 4-5 días de la infección, aunque la presentación a través del MHC I puede ocurrir incluso a las 12 horas de la infección. **(16)** Los antígenos micobacterianos presentados para activar los linfocitos T CD8⁺ incluyen proteínas de choque térmico de 38 KDa, 65KDa, proteína de 19 KDa y proteínas de secreción de la micobacteria como son ESAT-6 y CFP-10. **(21)**

Reconocimiento de antígenos micobacterianos en el contexto CD1

El CD1 es una molécula presentadora con una estructura similar al MHC de clase I. CD1 está presente en macrófagos, células dendríticas y monocitos; tiene la capacidad de producir IFN- γ e IL-2 mostrando fenotipos de memoria central y efectores, además de presentar antígenos de naturaleza lipídica de las micobacterias, entre ellos se encuentran

el ácido micólico, LAM, fosfatidil inositol manósido, monomicolato de glucosa y glicolípidos de isoprenoides. Los linfocitos T CD8⁺ se activan a partir de CD1. **(16, 23)**

Citocinas mediadoras de la respuesta inmune celular

Las citocinas son proteínas de 15-30 KDa de peso molecular esenciales para comunicación intercelular, y regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. A continuación se describen las citocinas más relevantes en la respuesta inmune hacia *M. tuberculosis*.

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

Juega un papel muy importante y complejo en la respuesta inmunopatológica a la infección por *M. tuberculosis*. La infección induce la producción de TNF- α en macrófagos, células dendríticas y los linfocitos T. En pacientes con TB, está presente en el sitio de la enfermedad y a nivel sistémico, es responsable de efectos inflamatorios como la fiebre y la pérdida de peso que presentan estos pacientes y se ha asociado con el deterioro clínico del paciente con niveles elevados de TNF- α en plasma, mientras que la recuperación se asocia con un decremento rápido del mismo. Por otra parte, esta citocina es necesaria para el control de la infección aguda por *M. tuberculosis*, ya que induce la producción de otras citocinas como la IL-1 y la IL-8 encargadas de reclutar a neutrófilos, su acción se sinergiza con el IFN- γ para la inducción de la apoptosis de los macrófagos alveolares infectados. **(16, 24)**

El TNF- α juega un papel muy importante en la formación y la persistencia del granuloma para contener la infección por *M. tuberculosis* y por lo tanto prevenir la diseminación de la infección. Se ha demostrado en ratones, que en ausencia de TNF- α y/o de su receptor, la respuesta granulomastosa es ineficiente y esto resulta en una muerte rápida del ratón con una gran carga bacilar; por otro lado, los granulomas que se forman son desorganizados,

con pocas células epitelioides alrededor y con linfocitos defectuosos (25). La importancia del TNF- α para contener la infección latente se ha corroborado en los seres humanos a partir del uso de los fármacos anti-TNF's (adalilubam, infliximab) útiles en el manejo de enfermedades reumatológicas, en quienes se ha reactivado la infección latente por *M. tuberculosis*. (25)

Además el TNF- α tiene implicaciones en la respuesta inmunopatológica del huésped en la TB, al ser un mediador importante en la destrucción de los pulmones por necrosis secundaria a la infección por *M. tuberculosis*. Hay estudios en los que se ha encontrado que existen niveles elevados de TNF- α en el sitio de infección en comparación con niveles sistémicos demostrando la "compartimentalización" de la respuesta inmune hacia *M. tuberculosis*. (26)

Interferón-gamma (IFN- γ)

Es la citocina más importante en el control de la infección por *M. tuberculosis*, es secretada por varios tipos de linfocitos T, siendo los más importantes los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y células NK. Las citocinas inductoras de IFN- γ comprenden IL-12, IL-18, IL-23, e IL-27. Los individuos con defectos en la producción de IFN- γ son susceptibles a infecciones serias, diseminadas o mortales por *M. tuberculosis*. Esta citocina activa a los macrófagos para destruir los bacilos intracelulares a través de la inducción de la óxido nítrico sintetasa. El IFN- γ es un regulador crítico de la presentación antigénica porque incrementan la expresión de moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras. (16, 24)

Aunque el IFN- γ juega un papel importante en el control de la infección por *M. tuberculosis*, por sí solo es insuficiente para controlar la infección. La producción es variable en cada individuo, se ha sugerido como un marcador de la infección por *M. tuberculosis* ya que algunos estudios indican que los niveles en sangre periférica están

disminuidos en pacientes con TB activa y que correlaciona con la extensión de la enfermedad a nivel pulmonar. **(27)**

Principales antígenos del complejo de *M. tuberculosis*

Early Secreted Antigenic Target (ESAT-6) y Culture Filtrate Protein (CFP-10)

ESAT-6 y CFP-10 están contenidos dentro de la región RD-1 del genoma de las micobacterias, la cual está ausente en la mayoría de micobacterias no tuberculosas. Ambas son proteínas de bajo peso molecular que son secretadas en el filtrado del cultivo de *M. tuberculosis* y otras micobacterias patógenas **(28, 29)**.

Los antígenos de secreción específicos de *M. tuberculosis* incluyen a CFP-10 (culture filtrate protein) de 10kDa y ESAT-6 (early secretory antigen target) de 6kDa encontrados principalmente para la distinción de pacientes con TB **(30)**. Tanto ESAT-6 como CFP-10 generan una respuesta inmune Th-1 y tienen un fuerte potencial de diagnóstico, tanto para la forma virulenta como para la forma latente de *M. tuberculosis*. **(31)**

CFP-10 y ESAT-6 recientemente se ha demostrado que tiene una función importante en la patogénesis de la TB. Este complejo muestra especificidad de unión con los complejos de superficie de los macrófagos, que son las células principalmente afectadas en la infección con *M. tuberculosis* **(32)**.

Derivado Proteico Purificado (PPD)

El derivado proteico purificado o PPD (también llamada tuberculina) se obtiene de los cultivos líquidos de *M. tuberculosis* libres de bacterias, los cuales son precipitados con sulfato de amonio, con lo que constituyen un extracto proteico de proteínas secretadas por las micobacterias. **(30)**

Técnicas de inmunodiagnóstico y evaluación de eficacia al tratamiento

El seguimiento de la eficacia del tratamiento en los casos de TB-MFR es difícil, costoso e impredecible. Se recomienda realizar una baciloscopía mensual. Si después de finalizado el segundo mes, dos o más baciloscopías mensuales consecutivas resultan positivas, es necesario realizar nuevamente cultivo y prueba de sensibilidad para verificar si los bacilos eliminados continúan vivos y comparar el perfil de resistencia con el perfil inicial. El tiempo para que la baciloscopía se convierta en negativa es mucho más lento en comparación con los casos fármaco-sensibles. Así, si bien, la baciloscopía es una guía importante para evaluar la respuesta terapéutica, no siempre resulta lo suficientemente sensible para detectar poblaciones escasas de bacilos y también puede detectar poblaciones de bacilos no viables dando una idea falsa de falla farmacológica. Por tanto, aunque el cultivo es la “prueba o estándar de oro” tanto para el diagnóstico como para el criterio de curación, este es un método limitado tanto por el crecimiento lento de *M. tuberculosis*, como depender de la calidad de la muestra clínica que se requiere, aunado a una baja sensibilidad, pues la calidad de la muestra requerida implica que se necesita tener una muestra con un mínimo de 10 - 100 bacilos **(33)**. Por lo tanto existe la necesidad de explorar el uso de técnicas inmunológicas más sensibles que nos permitan identificar biomarcadores útiles para evaluar la eficacia del tratamiento farmacológico contra la TB. **(34)**

Enzime-Linked InmunoSorbent SPOT (ELISPOT)

Es un método común utilizado para monitorear la respuesta inmune de seres humanos y animales que fue desarrollado por Cecil Czerkinsky en 1983.

Los ensayos ELISPOT fueron desarrollados a partir de una versión modificada de los ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El primer ELISPOT fue desarrollado para cuantificar a las células B secretoras de anticuerpos específicos, y luego

fue subsecuentemente adaptada para varias aplicaciones, especialmente para la identificación y enumeración de células productoras de citocinas. **(35)**

La inmunidad adaptativa es un componente importante para la eliminación de los patógenos intracelulares. La habilidad para detectar y cuantificar esta respuesta en humanos es una herramienta importante de diagnóstico. El ELISPOT está ganando popularidad por su habilidad de identificar la respuesta celular inmune contra los antígenos microbacterianos, incluyendo a las personas inmunosuprimidas tales como aquellas infectadas con el VIH. El ELISPOT es versátil en su capacidad para evaluar la respuesta inmune en la sangre periférica, así como en los sitios de infección activa de TB, tal como el lavado broncoalveolar y fluido espinal cerebral. La detección de la respuesta inmune contra uno o varios antígenos es posible, así como epítopes específicos con proteínas microbianas. Además el ensayo de ELISPOT a dos colores para la detección simultánea de dos citocinas también está disponible. Recientes aplicaciones para esta técnica incluyen el diagnóstico de TB extrapulmonar, como también contribuye para la investigación de antígenos infecciosos en enfermedades autoinmunes. **(36)**

Particularmente, se ha demostrado que existe una respuesta específica de las células T productoras de IFN- γ a la estimulación del polipéptido ESAT-6, presente casi exclusivamente en *M. tuberculosis*. **(37)**

Estudios previos han demostrado que la frecuencia de células T productoras de IFN- γ correlaciona estrechamente con la carga bacteriana y que la frecuencia de células productoras de IFN- γ en respuesta específica a el antígeno ESAT-6 disminuye progresivamente con el tratamiento anti-tuberculosis **(38)**. Estos resultados sugieren que la frecuencia de las células T productoras de IFN- γ en respuesta a diferentes antígenos micobacterianos podrían ser de gran utilidad para monitorear la eficacia del tratamiento anti-micobacteriano. Hasta el momento no hay ningún estudio que haya utilizado esta estrategia (por ELISPOT) para monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes con TB-MFR.

Justificación

En pacientes con tuberculosis Multifármaco-resistente (TB-MFR) que reciben tratamiento con fármacos de segunda línea, el diagnóstico y el criterio de curación es principalmente bacteriológica; sin embargo, la baciloscopía no es lo suficientemente sensible para detectar poblaciones escasas de bacilos una vez que se ha iniciado el tratamiento y, por otro lado, puede detectar poblaciones de bacilos no viables dando una idea falsa de falla farmacológica. Por otra parte, el cultivo es la mejor forma de evaluar estos parámetros ya que permite el crecimiento bacteriano, pero su uso es limitado en el seguimiento del tratamiento, lo que repercute en pérdida de tiempo para tomar decisiones terapéuticas que podrían beneficiar a los pacientes.

Hasta el momento no hay ningún estudio que haya utilizado una estrategia alternativa al cultivo para monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes con TB-MFR y no se cuenta con un marcador subrogado que pueda predecir y determinar éxito o fracaso terapéutico a corto plazo en estos pacientes. Dado que una de las principales causas de atención de TB pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) es la TB-MFR por ello es importante implementar técnicas de inmunodiagnóstico que permitan identificar biomarcadores útiles en la valoración de la eficacia al tratamiento farmacológico de la TB-MFR.

Hipótesis

En pacientes con TB-MFR el gran número de micobacterias en el pulmón induce la activación y expansión de células T productoras de IFN- γ una vez que el tratamiento es efectivo y las bacterias son eliminadas y la frecuencia de estas células disminuyen. Por lo tanto la medición de la frecuencia de estas células puede ser útil como biomarcador de respuesta al tratamiento de la TB-MFR.

Objetivo

Objetivo general

Evaluar la frecuencia de las células T productoras de IFN- γ en respuesta a la estimulación *in vitro* con ESAT-6, CFP-10 y PPD en pacientes con TB-MFR durante el tratamiento anti-tuberculosis con fármacos de segunda línea utilizando la técnica de ELISPOT.

Objetivos Específicos

1. Obtener muestras de sangre periférica de 18 pacientes con diagnóstico de TB-MFR, separar las células mononucleares y realizar un banco de células a -80°C .
2. Evaluar la frecuencia de células mononucleares de sangre periférica productoras de IFN- γ en respuesta a ESAT-6, CFP-10, PPD y PHA en las muestras de los pacientes antes del tratamiento y durante el tratamiento.
3. Comparar las células T productoras de IFN- γ con los cultivos y baciloscopías en los pacientes durante el tratamiento.
4. Realizar el seguimiento bacteriológico a través del registro de baciloscopías y cultivos mensuales.

Métodos

Grupo de estudio.

18 Pacientes con diagnóstico de TB-MFR confirmada bacteriológicamente (resistencia a isoniazida y a rifampicina) que cumplan con los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de TB-MFR confirmada bacteriológicamente con cultivo de *M. tuberculosis* en cuyas pruebas de susceptibilidad exista resistencia a rifampicina e isoniazida.
- Pacientes que se encuentren bajo la estrategia TAES (tratamiento acortado estrictamente supervisado).
- Hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 60 años.
- Prueba de VIH por ELISA negativo.
- Pacientes cuyo lugar de residencia les permita acudir mensualmente a las evaluaciones médicas.
- Pacientes que otorguen su consentimiento informado por escrito.

2. Criterios de exclusión

- Pacientes con contraindicación médica para recibir tratamiento con cualquiera de los fármacos anti-tuberculosis (insuficiencia hepática, insuficiencia renal, alergia conocida a algún fármaco anti-tuberculosis, etc.).
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con alcoholismo o adictos a algún tipo de droga.
- Indigentes.

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

3. Criterios de eliminación

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

Muestras biológicas.

De cada paciente con TB-MFR, se obtuvieron muestras de esputo y de sangre periférica (24mL) por flebotomía en tubos CPT (BD, San José CAL) previos al tratamiento anti-tuberculosis, y durante el tratamiento a 1, 2, 3, 6, 12, 15 y 18 meses.

Separación de células mononucleares.

Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) centrifugando los tubos CPT durante 30 minutos a una velocidad de 2500 rpm a temperatura ambiente. Se identificó el halo leucocitario y fue separado con ayuda de una pipeta de transferencia colocándolo en un tubo cónico de 50mL estéril al cual se le agregó 40mL de medio RPMI-1640 (Lonza, Walkersville MD) suplementado con glutamina (Lonza, Walkersville MD) y gentamicina (Lonza, Walkersville MD).

Una vez hecho esto, el tubo fue centrifugado durante 15 minutos a 1200 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante por decantación en un recipiente con cloro y con la ayuda de una punta de 1mL se eliminó el remanente de medio y después se resuspendió el paquete celular por agitación en vortex a una velocidad de 6. Se le agregó medio RPMI-1640 G+G hasta 50mL y se repitieron los pasos anteriores una vez más. Se resuspendieron las células en 1mL de medio RPMI-1640 G+G y se determinó la viabilidad utilizando el colorante de

exclusión azul de tripano (Lonza, Walkersville MD) en una dilución 1:2 (10 μ L de muestra y 10 μ L de azul de tripano).

Congelamiento de Células.

Se obtuvieron células en un promedio de 3×10^6 para cada vial y dependiendo del paciente se obtuvieron de 2-4 viales. Una vez obtenido el número de células se adicionaron 50mL de medio RPMI-1640 G+G a los tubos, y se centrifugaron a 1200 rpm temperatura ambiente por 15 minutos.

Se decantó el sobrenadante en un recipiente con cloro y con ayuda de una punta de 1mL se eliminó el líquido remanente. Dependiendo del número de células obtenidas, se hizo una preparación de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, Road Logan Utah) con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), se colocó 1mL por cada vial, fueron etiquetados y congelados a -80°C hasta el momento de utilizarse.

Descongelamiento de células

Las células (PBMCs) previamente obtenidas y puestas en congelación fueron colocadas en baño maría calentado a 37°C, y una vez descongeladas fueron colocadas en tubos de 14mL con 9mL de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (RPMI-1640+SFB). Una vez hecho esto fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se desechó el sobrenadante en un recipiente con cloro al 10% y al paquete celular se le colocó 1mL de medio RPMI-1640 + SFB, se calculó la viabilidad y número de células y se ajustaron a una concentración de 2×10^5 células por cada 100 μ L.

Técnica de ELISPOT - IFN- γ

Se utilizaron placas de 96 pozos ImmunoSpot (Millipore, Bedford MA).

Los pozos de las placas fueron pre-humedecidos con 100 μ L/pozo de etanol al 20% eliminándolo inmediatamente sobre una cama de gasas estériles. Se eliminaron los remanentes del alcohol mediante dos lavados con 200 μ L/pozo de PBS estéril (Lonza, Walkersville MD), después se agregó el anticuerpo de captura anti-interferón gamma (IFN- γ) (Thermo Scientific, Rockford IL) para humano, el cual fue diluido en PBS estéril (11.3 μ L de anticuerpo en 10.5 mL de PBS estéril) , se colocaron 100 μ L/pozo y se dejó incubar durante toda una noche a 4°C. Se eliminó el anticuerpo lavando la placa 3 veces con 200 μ L/pozo de PBS estéril y se dejó bloquear durante una hora con 200 μ L/pozo de PBS-BSA (por sus siglas en ingles Bovine Serum Albumin) al 1%. Después se lavó la placa 3 veces con 200 μ L/pozo de PBS estéril.

Se agregaron las PBMCs a una concentración de 2×10^5 en 100 μ L (es decir, 200 000 células por pozo por condición), se estimularon con: la proteína ESAT-6 10 μ g/mL y CFP-10 10 μ g/mL (Lionex GmbH), 10 μ g/mL PPD (laboratorio Statens Serum institute, Copenhagen Denmark) y el mitogeno PHA 10 μ g/mL (Sigma, St. Louis MO) y se incluyó una condición con medio como control negativo con un volumen de 100 μ L/pozo, dando como volumen final 200 μ L/pozo. Después las células se incubaron a 37°C por 16 a 24 horas.

Posteriormente las células se eliminaron mediante 3 lavados con 200 μ L/pozo de PBS estéril y 3 lavados con 200 μ L/pozo de PBS-Tween al 0.05% para lizar las células remanentes en la placa. Después se preparó el segundo anticuerpo biotinado (Thermo Scientific, Rockford IL) diluido en PBS-BSA, colocando 100 μ L por pozo y se dejó incubar durante 2 horas a 4°C, después de esto se hicieron 3 lavados con PBS-Tween al 0.05% y se preparó la streptavidina peroxidasa HRP (Dako Cytomation, Glostrup Denmark) (1 μ L por cada 2mL de PBS-BSA) y se colocaron 100 μ L/pozo de la dilución, se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con 200 μ L/pozo de PBS estéril para

eliminar el sobrante de la dilución de HRP. El IFN- γ se detectó después de la adición de 3-amino-9-Etil Carbazol (AEC) (Pierce, Rockforf IL) al 1% disuelto en buffer acetatos 0.01M (1:30, pH 5) y pasándolo por un filtro de 0.45 μ m para después agregarle peróxido de hidrógeno. De esta forma se visualizaron pequeños puntos (spots) que corresponden a la citocina liberada por cada una de las células. La frecuencia de las células productoras de IFN- γ en cada pozo se determinó usando el equipo ImmunoSpot Analyzer (software versión 3.2, Cellular Technology Ltd).

Análisis de datos

Cada punto (spots) fue considerado como una unidad formadora de *spot* (UFS), se contabilizaron los puntos en cada pozo y de los duplicados de cada condición se realizó un promedio por duplicado y los resultados fueron reportados como UFS 1×10^6 células. Los datos de las UFS antes, durante y al final del tratamiento fueron analizados con la prueba estadística ANOVA con repetidas mediciones seguido de una prueba de Dunnet's para comparaciones múltiples incluida utilizando el paquete GraphPad Prism (software versión 6.1). Posteriormente, se realizó una prueba de Rho de Spearman para evaluar la correlación entre las unidades formadoras de Spots (UFS) y el tiempo de negativización del cultivo, una $P \leq 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0 (MapInfo Corporation, Troy, NY).

Una respuesta positiva en células sin estímulo se define como aquéllos individuos que produzcan más de 20 UFS. Para las muestras estimuladas con los antígenos de secreción ESAT-6 y CFP-10 una muestra es considerada como positiva si tiene más de 20 UFS después de haber restado la producción basal de IFN- γ (menos medio).

Resultados

Grupos de estudio

Dentro del periodo del 2010 al 2011 fueron incluidos 18 pacientes con TB-MFR, de los cuales 6 terminaron el tratamiento, 9 abandonaron el estudio, 2 abandonaron el tratamiento y un paciente falleció durante el seguimiento.

El presente estudio se enfocó al análisis de los 6 pacientes que concluyeron con el tratamiento. Donde el 66.6% (4) fueron hombres y el 33.4% (2) fueron mujeres con una media de edad de 46 +- años. El 33.4% de los pacientes (2 pacientes) tenían como comorbilidad a la Diabetes Mellitus tipo 2, con un tiempo promedio de evolución de 10 años (Tabla1). Todos los pacientes fueron tratados con un esquema estandarizado de fármacos de segunda línea durante 24 meses.

Los cultivos para *M. tuberculosis* de muestras de esputo fueron negativas a los 3 meses en 5 pacientes y en uno de los pacientes fue negativa al mes de tratamiento. En las baciloscopías 5 pacientes dieron como negativo en el tercer mes de tratamiento, mientras que el restante dio negativo al mes 10. Cabe mencionar que todos los pacientes tuvieron cultivo para *M. tuberculosis* y baciloscopía negativos al final del tratamiento y fueron declarados como curados.

Tabla 3. Características demográficas de los pacientes

CARACTERÍSTICAS		n=6
GÉNERO	Hombres	4 (66.6%)
	Mujeres	2 (33.4%)
EDAD (mediana)	Hombres	54 (21-70)
	Mujeres	40 (19-61)
Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)	Hombres	1 (16.6%)
	Mujeres	1 (16.6%)
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Negativo	5
	No realizado	1

Muestras biológicas obtenidas durante el tratamiento

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los pacientes con TB-MFR durante el tratamiento de 24 meses con fármacos de segunda línea. Estas muestras fueron colectadas antes del tratamiento, 1 mes, 3 y 6 meses en 6 de los 6 pacientes; a una semana, 10, 11, 15, 16 y 18 meses en 2 de 6 pacientes; a 2 semanas en 4 de 6 pacientes; a 9 y 12 meses en 3 de 6 pacientes; a 8, 13, 17, 19, y 20 meses en 1 de 6 pacientes y a 22 meses en 5 de los 6 pacientes. En cada muestra se evaluó la frecuencia de células productoras de IFN- γ en respuesta a antígenos de secreción de *M. tuberculosis* por el método de ELISPOT (figura 3).

Figura 3. Imagen representativa de ELISPOT.

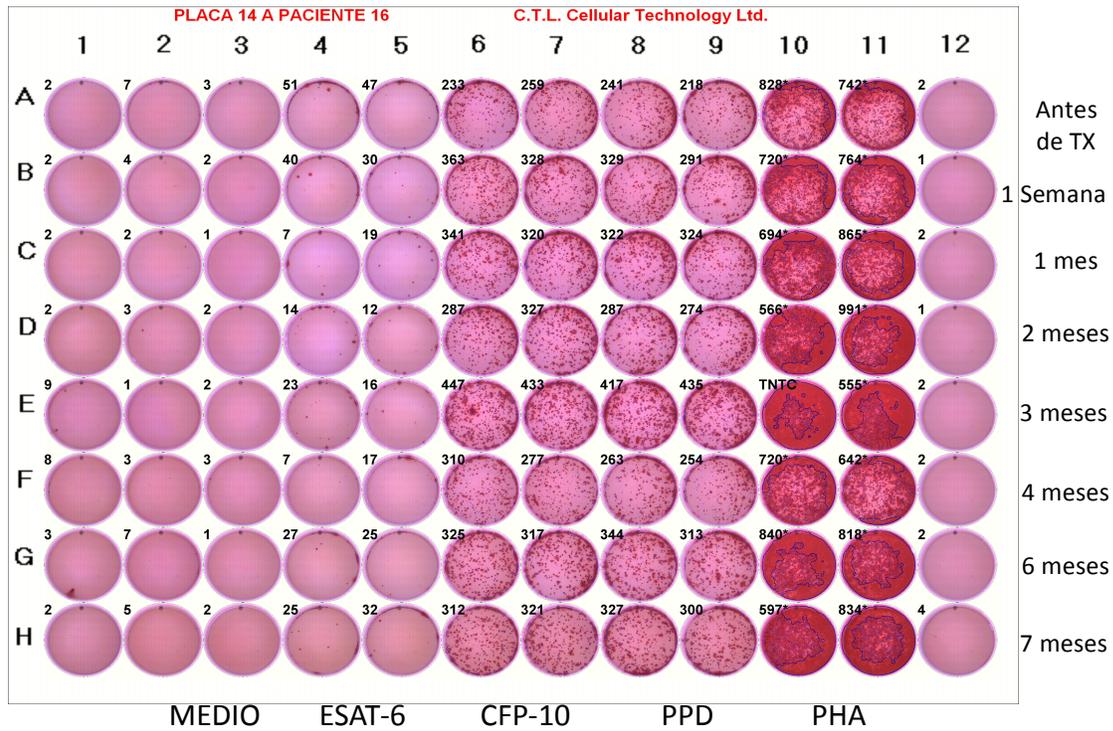


Figura 3. Placa representativa de ELISPOT para evaluar la frecuencia de células productoras de IFN- γ hacia diferentes estímulos. Se colocaron 2×10^5 células/pozo por duplicado (filas 2-3, Medio; filas 4-5, ESAT-6; filas 6-7, CFP-10; filas 8-9, PPD; filas 10-11, PHA) en muestras antes de tratamiento (A), a una semana (B), un mes (C), dos meses (D), 3 meses (E), 4 meses (F), 6 meses (G), 7 meses (H) después de iniciado el tratamiento. Los valores que se muestran en la imagen indican las unidades formadoras de Spots (UFS) analizados con el ImmunoSpot Image Analyzer (software versión 3.2, Cellular Technology Ltd.)

Frecuencia de células productoras de IFN- γ como respuesta al tratamiento en pacientes con TB-MFR.

Para evaluar la presencia de células productoras de IFN- γ *ex-vivo*, que corresponde a la producción basal de células productoras de IFN- γ , se incubaron células mononucleares sin estímulo durante 24 horas en placas de ELISPOT. De todos los pacientes; esto se hizo en cada uno de los tiempos de estudio, durante el seguimiento del tratamiento. Los resultados analizados de forma grupal muestran que los pacientes tienen una baja frecuencia de células productoras de IFN- γ *ex-vivo* con respecto al punto de corte (figura 4a).

Debido a que no se detectaron células productoras de IFN- γ positivas en las muestras de pacientes sin estímulo, se analizó la producción de IFN- γ en respuesta a los antígenos de secreción de *M. tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 y PPD. El análisis del grupo muestra que la frecuencia de células productoras de IFN- γ en respuesta a los antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 y CFP-10) fue positiva antes, durante y hasta el final del tratamiento (figura 4 b y c), y este mismo fenómeno se observa al estimular las células con los antígenos del Derivado Proteico Purificado de *M. tuberculosis* (PPD) (figura 4 d).

En respuesta a ESAT-6, la frecuencia de células productoras de IFN- γ del grupo fue positiva antes del tratamiento y varía durante y al final del tratamiento (figura 4 b) sin diferencias significativas ($p > 0.05$). Respecto a la frecuencia de células productoras de IFN- γ en respuesta a CFP-10 y PPD, antes del tratamiento fue de 365 y 411 UFS respectivamente, su frecuencia fue constante durante el tratamiento y al final del mismo se duplicó esta frecuencia sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Aunque la frecuencia de células productoras de IFN- γ durante el tiempo de tratamiento fue positiva hacia los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD, no se observó un patrón de aumento o decremento de la frecuencia de células productoras de IFN- γ (figura 4).

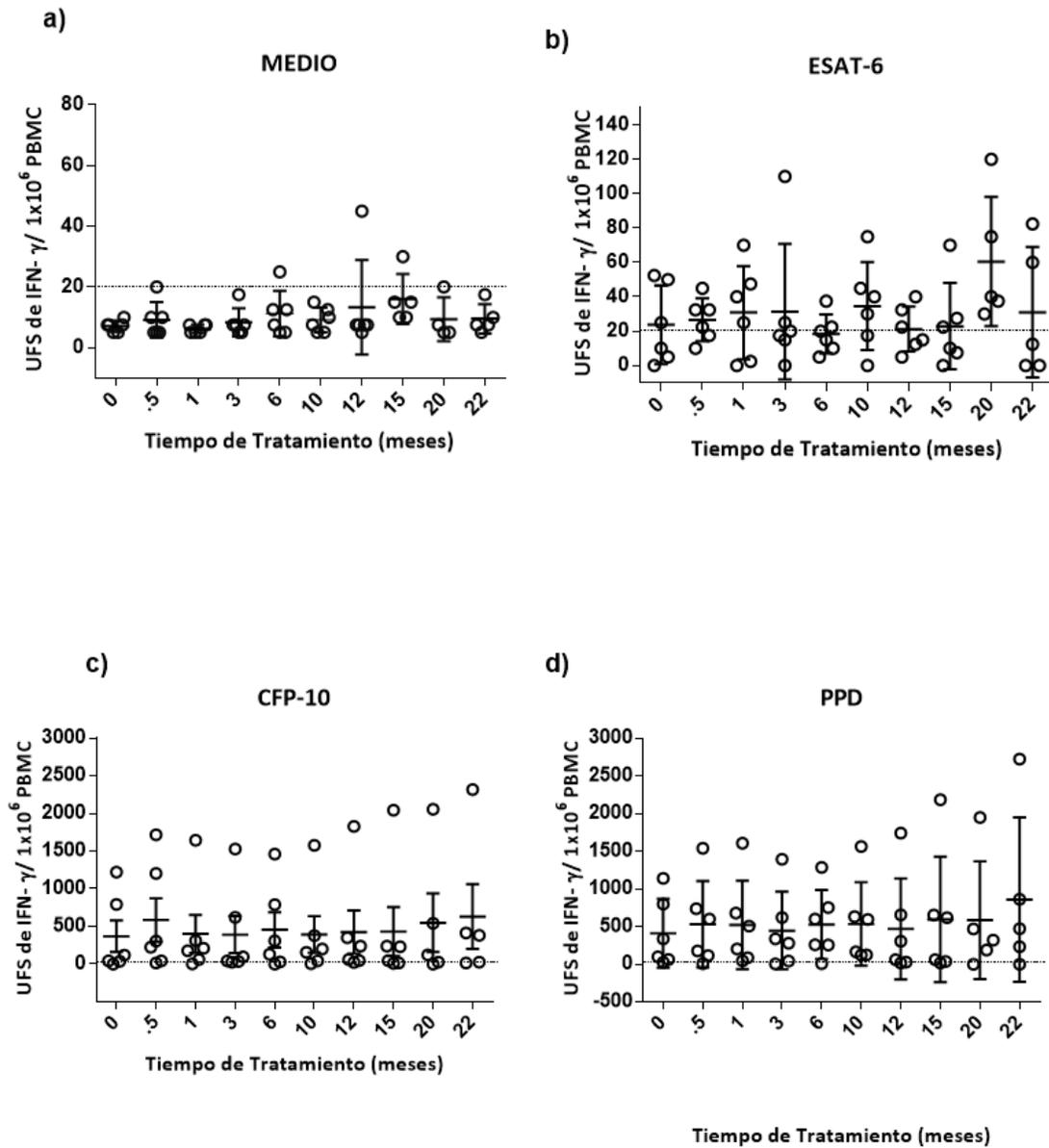


Figura 4. Células productoras de IFN-g determinadas por ELISPOT, de pacientes con TB-MFR. Las PBMC de los pacientes se estimularon por 24 h con: a) sin estímulo, b) ESAT-6, c) CFP-10 y d) PPD. Los datos se presentan como Unidades formadoras de spots (UFS) por cada millón de PBMC. Las líneas horizontales representan la media y las barras de dispersión la desviación estándar.

Frecuencia de células productoras de IFN- γ como respuesta al tratamiento en cada paciente con TB-MFR.

Debido a que no observamos un cambio estadístico en el análisis grupal de los pacientes, analizamos de forma individual a cada uno de ellos.

En las células de los pacientes que se incubaron solo con medio, no observamos células productoras de IFN- γ mayores a 20 UFS (valor de corte para ser consideradas como positivas) antes del tratamiento. Durante el tratamiento las células productoras de IFN- γ fueron positivas solo en 2 pacientes, uno a los 6 y 12 meses (figura 5 a) y otro a los 15 meses del tratamiento (figura 5 f).

Cuando analizamos la respuesta hacia ESAT-6, se observó una respuesta positiva de células productoras de IFN- γ en el 50% de los pacientes (figura 6 c, d y e) al inicio del tratamiento. Durante el tratamiento todos los pacientes fueron positivos en diferentes meses y al final del tratamiento dos pacientes se mantuvieron positivos (figura 6). Lo interesante de este análisis individual fue que se observaron 3 patrones de comportamiento: el primero, se identificaron células productoras de IFN- γ antes del tratamiento y la frecuencia de estas células fue disminuyendo durante el tratamiento (figura 6 c y e), el segundo comportamiento fue un incremento de las células productoras de IFN- γ al final del tratamiento respecto al valor inicial (figura 6 d y f) y el tercero fue una frecuencia variable de las células productoras de IFN- γ durante el tratamiento (6 a y b).

Medio

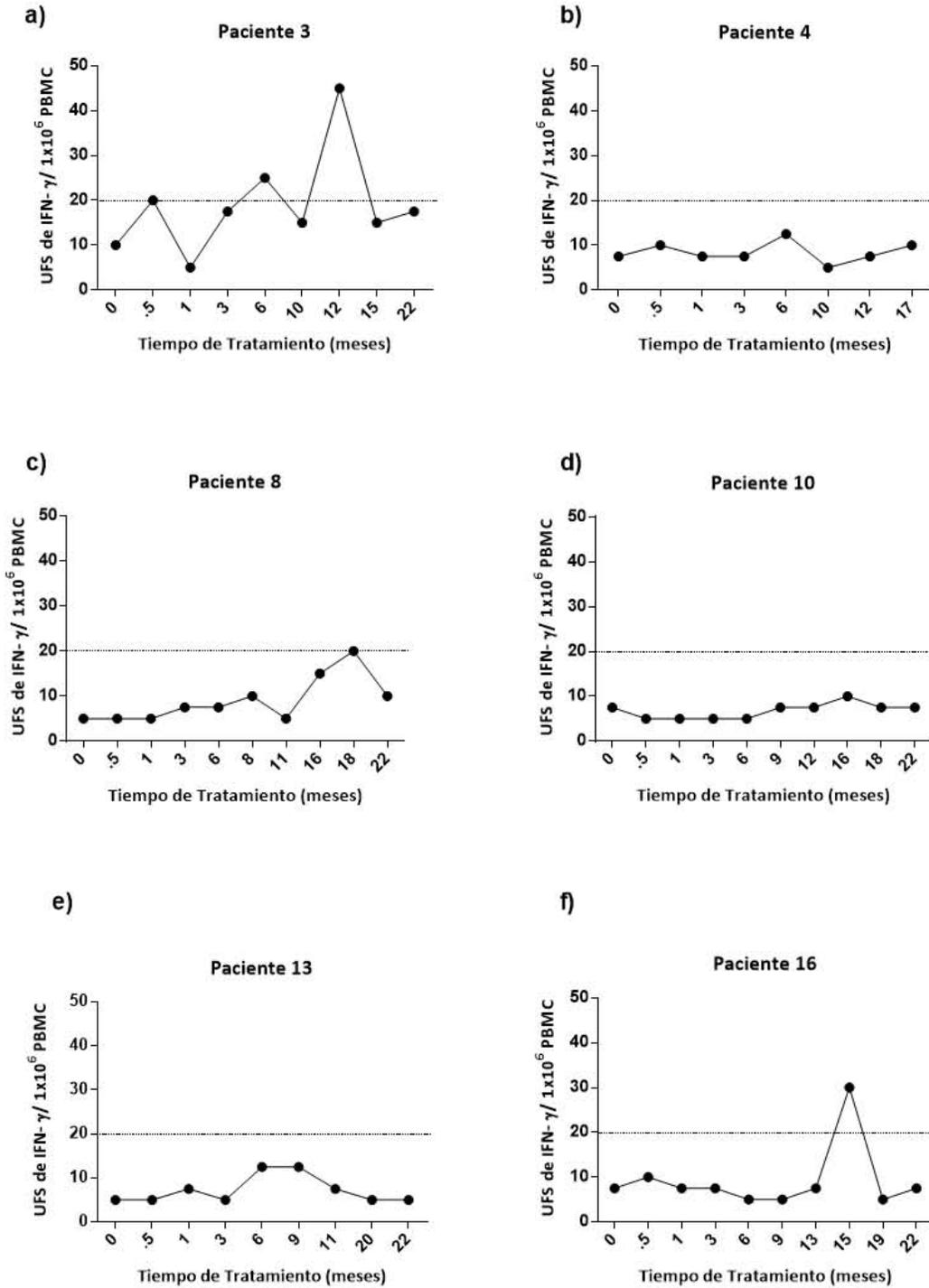


Figura 5. Frecuencia de células productoras de IFN- γ en muestras de pacientes con TB-MFR sin estímulo al inicio del tratamiento anti-tuberculosis, y durante el tratamiento. Esta condición fue usada como control negativo.

ESAT-6

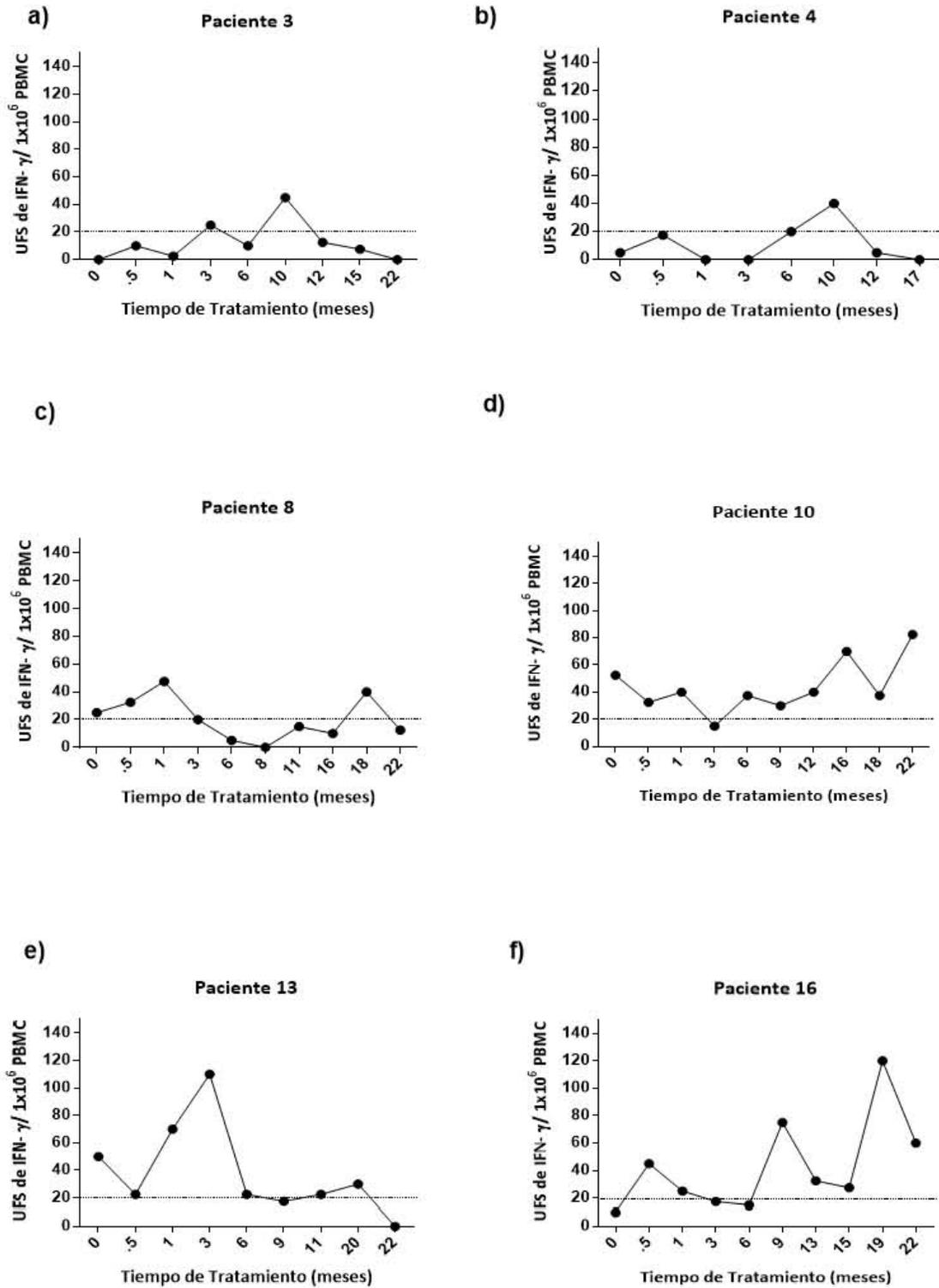


Figura 6. Frecuencia de células productoras de IFN- γ en muestras de pacientes con TB-MFR en respuesta al estímulo ESAT-6, evaluado al inicio, 1 semana, 1, 3, 5, 9, 12, 18 y 22 meses.

Respecto a las células productoras de IFN- γ en respuesta a CFP-10, al inicio del tratamiento la frecuencia fue positiva en el 83% de los pacientes (5 pacientes)(figura 7).

Durante en tratamiento, en dos pacientes observamos que la frecuencia de células productoras de IFN- γ se incrementaron en los primeros meses de tratamiento y al final del tratamiento esta frecuencia disminuye por debajo del nivel inicial (figura 7 c y e). En dos pacientes observamos lo contrario, ya que al inicio, la frecuencia de células productoras de IFN- γ es positiva, pero al avanzar el tratamiento mostró un aumento en la frecuencia de las células, con respecto al valor inicial (figura 7 d y f). En los dos pacientes restantes, uno fue negativo en la mayoría de las muestras y el otro se mantuvo positivo durante todos los meses de tratamiento (figura 7 a y b respectivamente).

Por último, evaluamos la frecuencia de las células T productoras de IFN- γ en respuesta a los antígenos del PPD. Antes del tratamiento la frecuencia de células productoras de IFN- γ fue positiva en el 100% de los pacientes (figura 8). Durante y al final del tratamiento se observan las siguientes respuestas: El paciente 2 con baja respuesta a PPD en la mayoría de las muestras (figura 8 a), el paciente 4 fue positivo hasta los 10 meses de tratamiento y presentó una disminución al final del tratamiento (figura 8 b), el paciente 13 que al inicio tenía una respuesta positiva de células productoras de IFN- γ y con el paso del tratamiento esa respuesta fue disminuyendo al final del tratamiento (figura 8 e) y los pacientes 8, 10 y 16 cuya frecuencia de células productoras de IFN- γ fue positiva antes del tratamiento y esta se incremento durante el tratamiento y se mantuvo alta al final del tratamiento (figura 8 c, d y f).

CFP-10

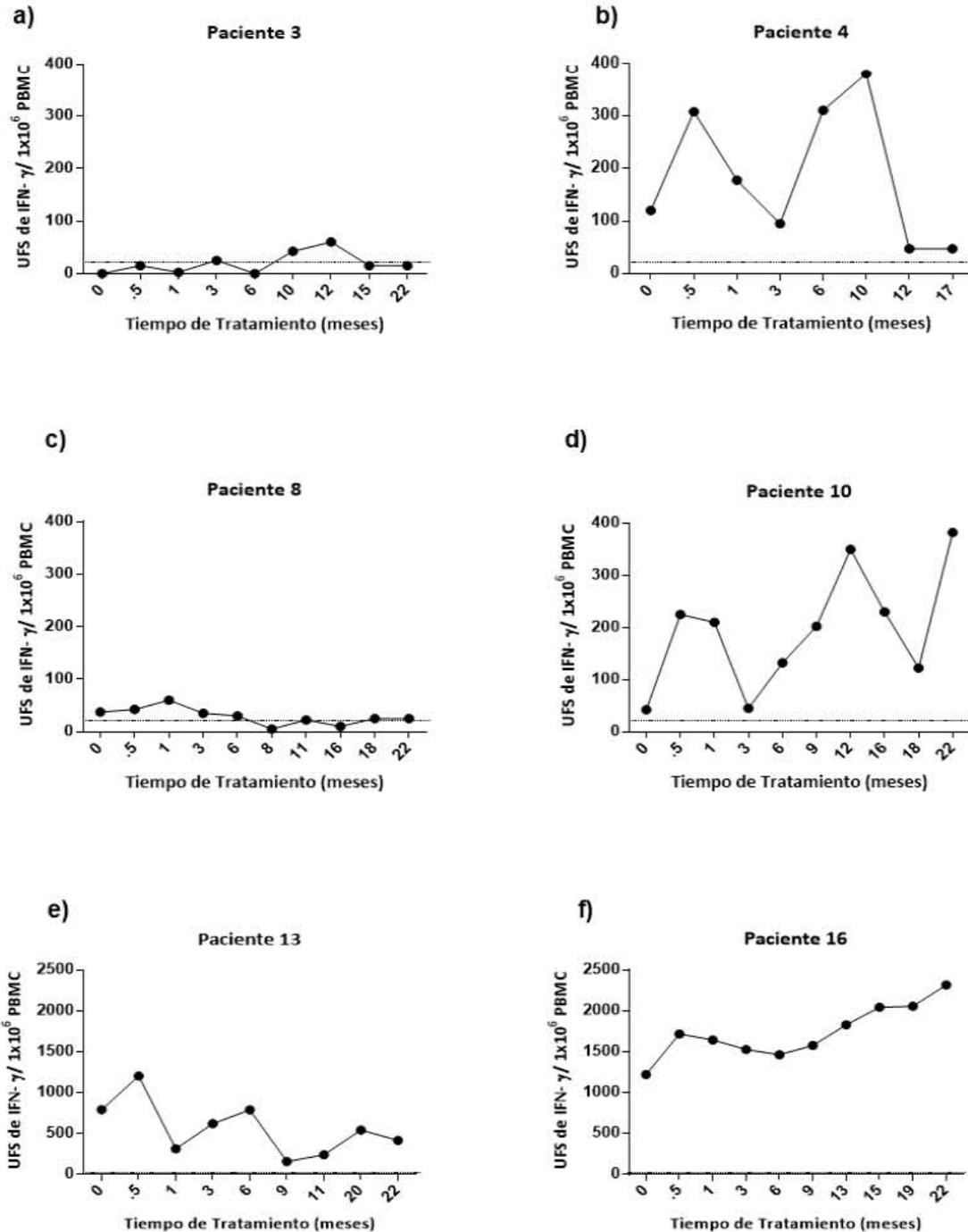


Figura 7. Frecuencia de células productoras de IFN- γ en muestras de pacientes con TB-MFR en respuesta al estímulo CFP-10, evaluado al inicio, 1 semana, 1, 3, 5, 9, 12, 18 y 22 meses. Se puede observar que en algunos pacientes no hay un aumento significativo, mientras que en otro (paciente 16) se puede observar un aumento gradual.

PPD

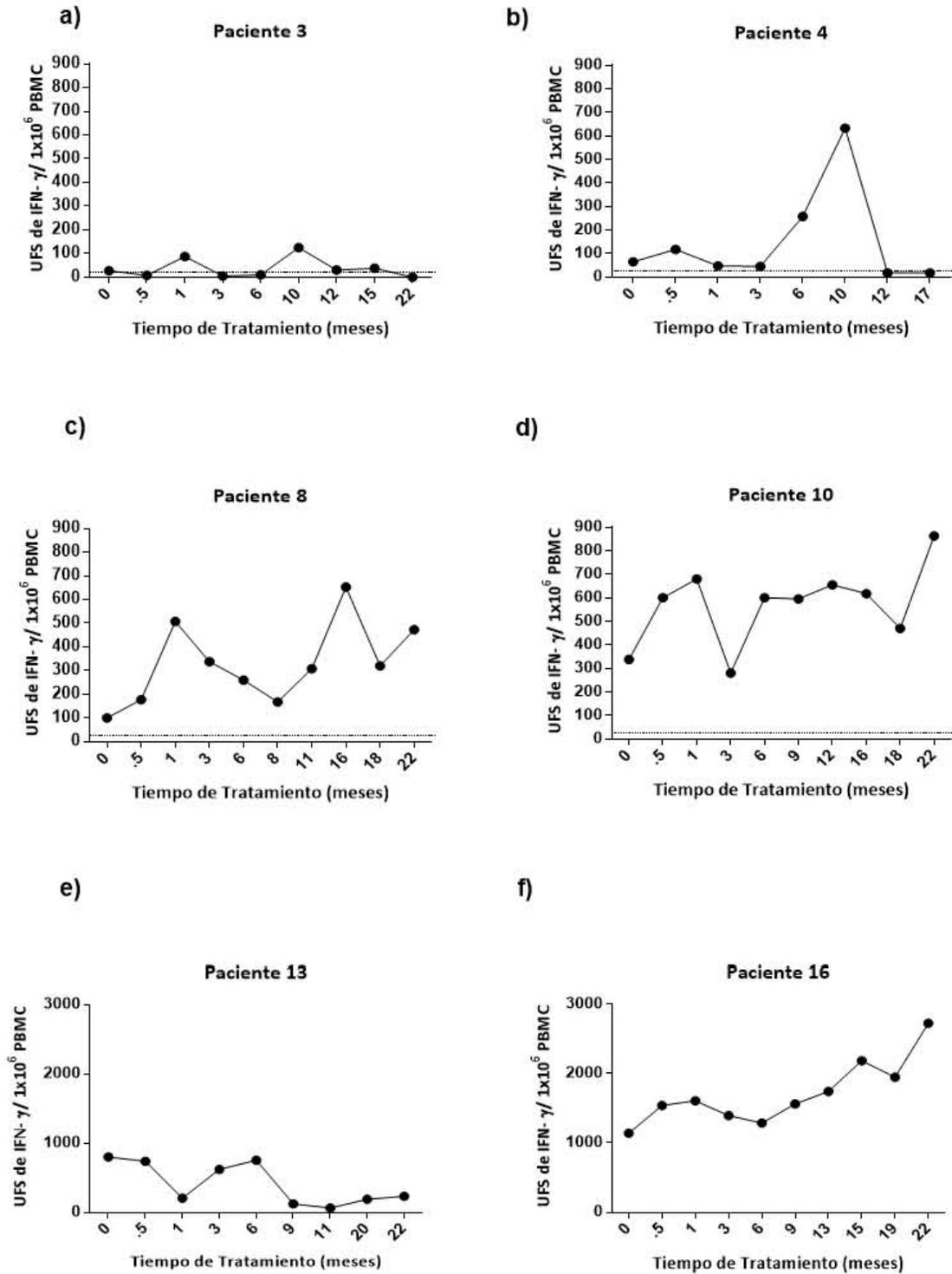


Figura 8. Frecuencia de células productoras de IFN- γ en muestras de pacientes con TB-MFR en respuesta al estímulo PPD, evaluado al inicio, 1 semana, 1, 3, 5, 9, 12, 18 y 22 meses.

Correlación de la frecuencia de células productoras de IFN- γ con el tiempo de negativización del cultivo de *M. tuberculosis*.

Para evaluar si hay una relación entre la frecuencia de células productoras de IFN- γ específicas a los antígenos ESAT-6 y CFP-10 y el tiempo al que los cultivos de *M. tuberculosis* fueron negativos, se realizó un análisis de correlación entre UFS de IFN- γ al mes de negativización. El análisis de los datos indican que no hay una correlación entre los valores de UFS con respecto a los tiempos de negativización del cultivo de *M. tuberculosis*, y con respecto al mes anterior a la negativización y el mes posterior de negativización (Coeficiente de correlación: .886, .829 y .943 respectivamente) (figura 9).

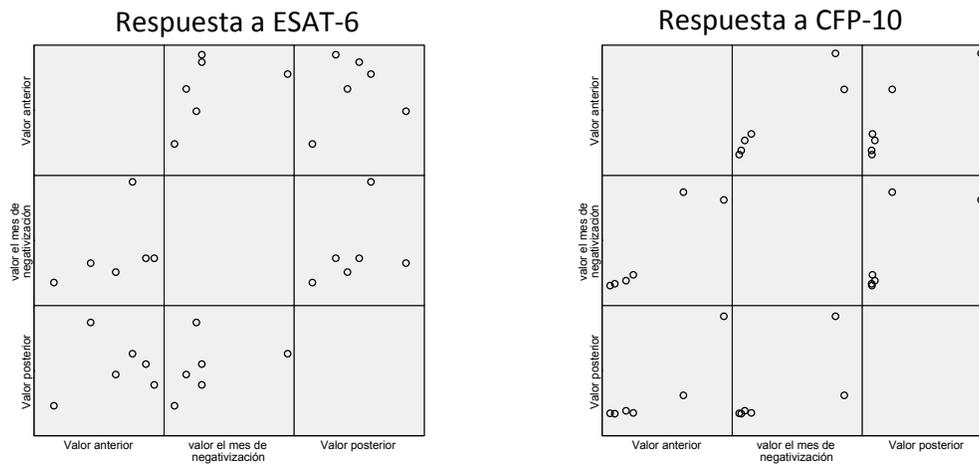


Figura 9. Correlación de la frecuencia de células productoras de IFN- γ (UFS) entre el tiempo de negativización del cultivo y el mes anterior y posterior en cada individuo. La gráfica de la izquierda muestra la correlación de las UFS en respuesta al antígeno ESAT-6 y la gráfica de la derecha al antígeno CFP-10, cada punto representa a un paciente. La correlación de los datos se realizó con una prueba de Rho de Spearman.

Discusión.

El método que actualmente se usa en diagnóstico y desenlace (curación, fracaso y recaída) del tratamiento en pacientes con TB fármaco sensible y TB-MFR es el cultivo de *M. tuberculosis*; sin embargo, la aplicación de este método bacteriológico es limitado en el seguimiento del tratamiento.

Como alternativas se han desarrollado métodos de inmunodiagnóstico basados en la liberación de IFN- γ IGRAS (por sus siglas en inglés Interferon Gamma Release Assays). Uno de ellos es el TB-Spot el cual se ha utilizado en el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de TB-fármaco sensible **(34)**. En este proyecto se evaluó la utilidad de este método por medio de un ELISPOT específico a IFN- γ en el seguimiento de pacientes con TB-MFR.

Reportes previos han mostrado que en pacientes con TB, la carga bacteriana está asociada al número de células productoras de IFN- γ en respuesta a los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10; durante el tratamiento anti-tuberculosis disminuye la carga bacteriana debido a que el tratamiento elimina a los bacilos y la frecuencia de células productoras de IFN- γ disminuye aunque en estos trabajos se estudiaron pacientes con TB fármaco sensibles y no a pacientes con cepas fármaco-resistentes **(38, 39)**.

Este es el primer estudio donde se evalúa la respuesta de células T específicas a los antígenos de *M. tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 y PPD en pacientes TB-MFR. Los resultados que obtuvimos en los pacientes con TB-MFR concuerdan con los estudios previamente mencionados arriba donde se observó que las células productoras de IFN- γ en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD antes del tratamiento se encuentran positivas; sin embargo, estas frecuencias no mostraron una disminución al finalizar el tratamiento. Una posible explicación a este resultado puede deberse a las diferencias en la enfermedad ya que todos los estudios previamente realizados analizan pacientes con TB activa fármaco

sensible y en este estudio se realizó en pacientes con TB-MFR. El tiempo de análisis también es diferente ya que en esos estudios anteriores evaluaron a las UFS (respuesta de IFN- γ) antes del tratamiento y a los 3 o 12 meses posteriores al tratamiento; analizando y comparando estos tiempos en nuestros pacientes con TB-MFR no observamos ningún cambio en la disminución de las células productoras de IFN- γ . Algunas explicaciones a la discordancia de nuestros resultados respecto a los publicados es que posiblemente la respuesta inmune en pacientes con TB-MFR puede ser diferente a la respuesta cuando las micobacterias son sensibles al tratamiento de primera línea, o bien que las diferencias genéticas de los pacientes (europeos en los estudios citados, contra mestizos en nuestro estudio) contribuyen a las diferencias en la respuesta inmune.

Utilizando el ensayo Quantiferon otro método de IGRAs que a diferencia del ELISPOT es un método cuantitativo de la producción de IFN- γ , los datos reportados han sido variables. En un estudio se observó que el análisis de la liberación de IFN- γ por la técnica de Quantiferon es difícil para monitorear el tratamiento de la TB fármaco sensible **(40)**. Sin embargo en otro estudio reportan que antes de la terapia hay concentraciones elevadas de IFN- γ y que la producción se mantienen positivas durante y al término de la misma en pacientes con TB fármaco-sensible, este comportamiento nosotros también lo observamos en pacientes con TB-MFR **(41)**. Una explicación a este resultado sugerida por los autores, es que los individuos posiblemente se estén re-exponiendo a *M. tuberculosis* o a otras micobacterias no tuberculosas que puedan dar una reacción cruzada en países endémicos como es la India, nuestro país también es considerado endémico y posiblemente pudiera ocurrir algo similar **(41)**. Con respecto a nuestro estudio, una posibilidad a este resultado puede ser que la eliminación de *M. tuberculosis* en pacientes con TB-MFR es más lenta, por lo cual las células T específicas a antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 y CFP-10) podría persistir incluso en muy bajos números e inducir una respuesta de IFN- γ por mucho más tiempo después de la eliminación de la bacteria. Por tanto, es necesario realizar estudios de seguimiento a largo plazo para determinar si hay disminución de la frecuencia de células T específicas.

Con respecto a la respuesta hacia PPD, un estudio realizado en Gambia en pacientes con TB fármaco sensible reportan que la respuesta a PPD es similar a la inducida por los antígenos ESAT-6 y CFP-10, en donde la frecuencia de células productoras de IFN- γ disminuye a lo largo del tratamiento anti-tuberculosis, y la limitante es que no permite discernir entre un paciente con TB activa y uno con TB latente **(42)**. Nuestros resultados concuerdan en el hecho de que la respuesta hacia PPD en algunos pacientes es similar a la respuesta observada hacia los antígenos ESAT-6 y CFP-10; sin embargo, a diferencia del estudio antes mencionado los pacientes con TB-MFR se mantienen positivos durante y al final del tratamiento.

Por último, el análisis de correlación entre la frecuencia de las células productoras de IFN- γ y los cultivos de *M. tuberculosis* no mostraron tener ninguna correlación al tiempo de negativización del cultivo y con respecto al mes anterior y posterior a la negativización del cultivo.

Los estudios de la respuesta inmune en pacientes con TB-MFR durante el tratamiento son escasos. Uno de ellos emplea la técnica de citometría de flujo para evaluar la producción de IFN- γ e IL-10 en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, MPT-51 y GlcB) y en ese estudio, lo autores observaron que hay una alteración en la respuesta de células CD4⁺ productoras de IFN- γ y una importante participación de las células CD8⁺ en la producción de estas citocinas, por lo que sería necesario realizar estudios posteriores utilizando la técnica de ELISPOT que distingan la respuesta entre CD4⁺ y CD8⁺. **(43)**

Es importante destacar que entre las limitaciones de este estudio se encuentran: las complicaciones en obtener el número de muestras por la dificultad de seguimiento, de abandono del tratamiento, decesos y muestras insuficientes.

Conclusión

La evaluación de la frecuencia de células T productoras de IFN- γ específicas a los antígenos de *M- tuberculosis* ESAT-6 y CFP-10 para evaluar la eficacia al tratamiento farmacológico en pacientes con TB-MFR es limitada debido a que no se observaron cambios a lo largo del tratamiento a pesar de un desenlace terapéutico exitoso en todos los pacientes.

Referencias

1. WHO. 2012. Global Tuberculosis Report 2012.
2. Salud Sd. 2009. *Estándares para la atención de la tuberculosis en México*
3. http://web.udl.es/usuarios/w4137451/webresp/contenidos_docentes/temario/pdf_temas/tuberculosis9.pdf
4. Aidar OA, M; Jave, A; Maria, J; Canedo, E. 2010. Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis.
5. García-Sancho C. 2001. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. una revisión de la literatura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 14: 114-28
6. Salud Sd. 2010. Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos.
7. Yancey D. 2008. *Tuberculosis: Twenty-First Century Books*
8. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>
9. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>
10. WHO. 2010. *Treatment of tuberculosis Guidelines*
11. Miranda GD, P.; Arancibia, P. 2004. Manifestaciones radiográficas de la tuberculosis. *Revista Chilena de Radiología* 10: 178-82
12. Laniado RC, N. 2005. No siempre un baciloscopía positiva indica tuberculosis. Otra razón para solicitar cultivos rutinariamente. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 18: 286-9
13. salud sd. 2008. Guía de practica clínica. In *Diagnóstico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis pulmonar*
14. WHO. 2011. Global Tuberculosis Report 2011.
15. Ugarte-Gil CÁ, M. P.; Moore, D. 2008. Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Médica Peruana* 25: 171-5
16. Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19: 93-129

17. Armstrong JA, Hart PD. 1971. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134: 713-40
18. Armstrong JA, Hart PD. 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 142: 1-16
19. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. 2002. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 15: 294-309
20. Bock N, Reichman LB. 2004. Tuberculosis and HIV/AIDS: epidemiological and clinical aspects (world perspective). *Semin Respir Crit Care Med* 25: 337-44
21. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. 2003. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb)* 83: 98-106
22. Gallegos AM, van Heijst JW, Samstein M, Su X, Pamer EG, Glickman MS. 2011. A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of M. tuberculosis infection in vivo. *PLoS Pathog* 7: e1002052
23. Montamat-Sicotte DJ, Millington KA, Willcox CR, Hingley-Wilson S, Hackforth S, Innes J, Kon OM, Lammas DA, Minnikin DE, Besra GS, Willcox BE, Lalvani A. 2011. A mycolic acid-specific CD1-restricted T cell population contributes to acute and memory immune responses in human tuberculosis infection. *J Clin Invest* 121: 2493-503
24. Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 213-32
25. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345: 1098-104
26. C. Prabha KVJ, Ram Prasad Matsa and Sulochana D. Das. 2003. Role of TNF-a in host immune response in tuberculous pleuritis. *current science* 85
27. Sodhi A, Gong J, Silva C, Qian D, Barnes PF. 1997. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 25: 617-20

28. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, Kok-Jensen A, Andersen P, Weldingh K. 2005. Prospective evaluation of a whole-blood test using Mycobacterium tuberculosis-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 491-6
29. Chege GK, Warren RM, Gey van Pittius NC, Burgers WA, Wilkinson RJ, Shephard EG, Williamson AL. 2008. Detection of natural infection with Mycobacterium intracellulare in healthy wild-caught Chacma baboons (Papio ursinus) by ESAT-6 and CFP-10 IFN-gamma ELISPOT tests following a tuberculosis outbreak. *BMC Microbiol* 8: 27
30. Stavri H, Bucurenci N, Ulea I, Costache A, Popa L, Popa MI. 2012. Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis. *Indian J Med Res* 136: 799-807
31. Meher AK, Bal NC, Chary KV, Arora A. 2006. Mycobacterium tuberculosis H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. *FEBS J* 273: 1445-62
32. Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, Gordon SV, Hewinson RG, Burke B, Norman J, Williamson RA, Carr MD. 2005. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J* 24: 2491-8
33. Salud OPdl. 2008. MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. In *NORMAS Y GUÍA TÉCNICA*, ed. ORdlOMdl Salud, pp. 114
34. Wang JY, Chou CH, Lee LN, Hsu HL, Jan IS, Hsueh PR, Yang PC, Luh KT. 2007. Diagnosis of tuberculosis by an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma. *Emerg Infect Dis* 13: 553-8
35. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65: 109-21

36. Chambers IR, Cone TR, Oswald-Richter K, Drake WP. 2010. Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT): Quantification of Th-1 cellular immune responses against microbial antigens. *J Vis Exp*
37. Lalvani A. 2007. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest* 131: 1898-906
38. Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, Amicosante M, Girardi E, Goletti D. 2004. Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy. *Clin Infect Dis* 38: 754-6
39. Lalvani A. 2004. Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment? *Clin Infect Dis* 38: 757-9
40. Takayanagi K, Aoki M, Aman K, Mitarai S, Harada N, Higuchi K, Okumura M, Yoshiyama T, Ogata H, Mori T. 2011. Analysis of an interferon-gamma release assay for monitoring the efficacy of anti-tuberculosis chemotherapy. *Jpn J Infect Dis* 64: 133-8
41. Pai M, Joshi R, Bandyopadhyay M, Narang P, Dogra S, Taksande B, Kalantri S. 2007. Sensitivity of a whole-blood interferon-gamma assay among patients with pulmonary tuberculosis and variations in T-cell responses during anti-tuberculosis treatment. *Infection* 35: 98-103
42. Aiken AM, Hill PC, Fox A, McAdam KP, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Donkor SA, Adegbola RA, Brookes RH. 2006. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases. *BMC Infect Dis* 6: 66
43. de Araujo-Filho JA, Vasconcelos AC, Jr., Martins de Sousa E, Kipnis A, Ribeiro E, Junqueira-Kipnis AP. 2008. Cellular responses to MPT-51, GlcB and ESAT-6 among MDR-TB and active tuberculosis patients in Brazil. *Tuberculosis (Edinb)* 88: 474-81

Anexos

La frecuencia de células T productoras de IFN- γ en respuesta a PHA el cual es un estímulo inespecífico fue utilizado como un control positivo, ya que por su característica de unión inespecífica genera una alta frecuencia de células productoras de citocinas reflejada en alto numero de UFS.

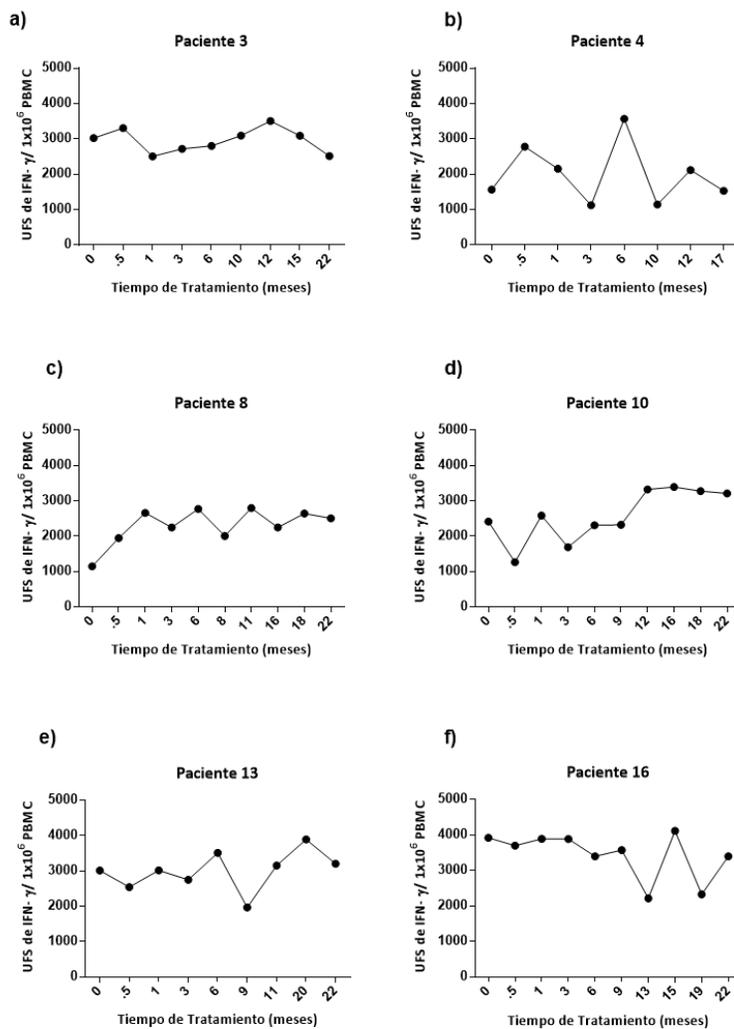


Figura 10. Frecuencia de células productoras de IFN- γ en muestras de pacientes con TB-MFR en respuesta al estímulo fitohemaglutinina (PHA), evaluado al inicio, 1 semana, 1, 3, 5, 9, 12, 18 y 22 meses de tratamiento.