



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Aplicación de la técnica de ELISpot Dual para evaluar la
frecuencia de células productoras de IFN- γ e IL-2 en
pacientes con tuberculosis pulmonar**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

María de Jesús Ramírez Lira



MÉXICO, D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: José Sullivan López González

VOCAL: Profesor: Rosalía Guevara Leonel

SECRETARIO: Profesor: Martha Torres Rojas

1er. SUPLENTE: Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría

2° SUPLENTE: Profesor: Beatríz Ruíz Villafan

**EL TEMA SE DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

Dra. Martha Torres Rojas
ASESORA

Dra. Ma. Teresa Herrera Barrios
SUPERVISOR TÉCNICO

María de Jesús Ramírez Lira
SUSTENTANTE

<u>ÍNDICE</u>	<u>PÁGINA</u>
Abreviaturas.....	II
Índice de Figuras.....	IV
Índice de Tablas.....	V
Introducción.....	1
Marco teórico	3
Generalidades sobre la Tuberculosis.....	3
Estadísticas actuales de la Tuberculosis.....	5
Características generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
a) Propiedades físicas y de crecimiento.....	7
b) Antígenos específicos.....	9
Respuesta inmunológica contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
a) Receptores que participan en el reconocimiento de <i>M.tuberculosis</i>	10
b) Endocitosis y presentación de antígenos peptídicos a los linfocitos T.....	11
c) Respuesta inmunológica celular.....	13
Diagnóstico para la tuberculosis.....	16
I. Baciloscopia y cultivo de esputo.....	16
II. Prueba de la tuberculina.....	17
III. Pruebas inmunológicas: IGRAs.....	18
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	23
Materiales y métodos	24
I. Población de estudio.....	24
II. Obtención de las muestras de sangre periférica.....	25
III. Separación y congelación de células mononucleares de sangre periférica.....	25
IV. Descongelación de células mononucleares de sangre periférica.....	26
V. Determinación del número de células productoras de IFN- γ e IL-2 mediante la técnica de ELISpot dual.....	27
a) ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (sistema manufacturado por Abcam, Inc).....	27
b) ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (sistema manufacturado por R&D Systems, Inc).....	29
VI. Control de calidad de los resultados de ELISpot dual.....	30
VII. Análisis estadístico.....	30
Resultados	31
Discusión de resultados	49
Conclusión	52
Bibliografía	53
Anexo I.....	VI

ABREVIATURAS

AEC	3-Amino-9-Etilcarbazol
APC	Célula presentadora de antígeno (del inglés: <i>Antigen Presenting Cell</i>)
BAAR	Bacilos Ácido Alcohol Resistentes
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato/nitroazul de tetrazolio
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CFP-10	Filtrado proteico del cultivo de 10 kilodaltons (del inglés: <i>Culture Filtrated Protein 10 KDa</i>)
DC-SIGN	Molécula intracelular específica a células dendríticas (del inglés: <i>Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule Grabbing Nonintegrin</i>)
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ELISpot	Del inglés: <i>Enzime-Linked ImmunoSpot</i>
ESAT-6	Antígeno de secreción temprana de 6 Kilodaltons (Del inglés: <i>Early Secretory Antigen Target 6 KDa</i>)
h	horas
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-23	Interleucina 23
I	Isonomicina
IFN-γ	Interferón gamma
IGRAs	Ensayos de producción de IFN γ (del inglés: <i>Interferon-gamma Release Assays</i>)
KDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
LTBI	Tuberculosis latente (del inglés: <i>Latent Tuberculosis Infection</i>)
ManLAM	Lipoarabinomanan-manosa
MDR	Multifármaco-resistente (del inglés: <i>Multi-Drug Resistant</i>)
min	minutos
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NEMO	(Del inglés: <i>NF-κB Essential Modulator</i>)
NF-κB	Factor Nuclear-kappa-B
NLR	Receptores parecidos a NOD (del inglés: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-</i>

	<i>(NOD-) like receptors)</i>
NOS-2	Óxido Nítrico Sintetasa Inducible
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PAS	Paraaminosalicílico
PBS	Buffer de fosfatos (del inglés: <i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Acetato de forbol-miristato (del inglés: <i>Phorbol 12-miristyl-13-acetate</i>)
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patógenos (del inglés: <i>Pathogen Recognition Receptors</i>)
PPD	Derivado proteico purificado (del inglés: <i>Protein Purified Derivated</i>)
seg	Segundos
SFB	Suero Fetal Bovino
Sp-A	Proteína surfactante-A
STAT-1	Del inglés: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription-1</i>
T.A	Temperatura ambiente
TAM	Receptores Tirocincinasa (Tyro3/Axl/Mer)
TB	Tuberculosis
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF-α	<i>Tumoral Necrosis Factor-alpha</i>
TST	Prueba de la tuberculina en piel (del inglés: <i>Tuberculin Skin Test</i>)
UFS	Unidades Formadoras de Spots
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE DE FIGURAS**PÁGINA**

FIGURA 1	Incidencia mundial de nuevos casos de todas las formas de TB estimada por cada 100 000 habitantes.....	6
FIGURA 2	Características de las micobacterias.....	8
FIGURA 3	RD-1 (<i>Region of Difference-1</i>) en <i>M.tuberculosis</i>	9
FIGURA 4	Sinapsis inmunológica entre una célula presentadora de antígeno y un linfocito T.....	15
FIGURA 5	Aplicación y lectura del PPD.....	18
FIGURA 6	Procedimiento de la técnica de ELISpot dual (Abcam, Science Park, Cambridge).....	21
FIGURA 7a	Determinación del número de células productoras de IFN- γ en respuesta a PHA o PMA+I	34
FIGURA 7b	Determinación del número de células productoras de IL-2 en respuesta a PHA o PMA+I.	35
FIGURA 8a	Determinación del número de células productoras de IFN- γ en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD.....	38
FIGURA 8b	Determinación del número de células productoras de IL-2 en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD.....	39
FIGURA 8c	Porcentaje de casos positivos para IFN- γ o para IL-2 en respuesta a ESAT-6, CFP-10 y PPD.....	40
FIGURA 9a	Determinación del número de células productoras de IFN- γ en pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos.....	44
FIGURA 9b	Determinación del número de células productoras de IL-2 en pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos.....	45
FIGURA 9c	Determinación del número de células productoras de IL-2 en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD en pacientes con TB pulmonar activa.....	46
FIGURA 10a	Porcentaje de casos positivos para IFN- γ en células de pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos.....	47
FIGURA 10b	Porcentaje de casos positivos para IL-2 en células de pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos.....	48
FIGURA 11	Imagen de un pozo representativo de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2, sistema Abcam....	IV
FIGURA 12	Imagen de un pozo representativo de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2, sistema R&D.....	IV

ÍNDICE DE TABLAS**PÁGINA**

Tabla 1	Características de los grupos de estudio.....	31
Tabla 2	Comparación entre PHA y PMA+I para obtener de la máxima activación celular	33
Tabla 3	Comparación de dos sistemas de ELISpot dual para evaluar el número de células productoras de IFN- γ e IL-2, en respuesta a antígenos micobacterianos.....	37
Tabla 4	Número de células productoras de IFN- γ de pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos en respuesta a antígenos micobacterianos.....	43
Tabla 5	Número de células productoras de IL-2 de pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos en respuesta a antígenos micobacterianos.....	43

INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* y representa uno de los problemas de salud más graves a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que un tercio de la población mundial está infectada con *M.tuberculosis*, pero sólo el 10% desarrollará la enfermedad. Algunos factores que contribuyen al desarrollo de la TB incluyen a los factores genéticos, ambientales, el diagnóstico erróneo y/o un deficiente apego al tratamiento. La forma más frecuente de TB es la pulmonar, y este padecimiento continúa siendo un problema emergente por el número elevado de muertes que causa, siendo una enfermedad secundaria a la diabetes, obesidad y enfermedades por inmunodeficiencias. Actualmente existen diferentes metodologías para diagnosticar a la TB pulmonar, como son la baciloscopía y el cultivo de muestras del esputo de los pacientes, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs; *Interferon-gamma Release Assay*). La técnica de referencia para el diagnóstico sigue siendo el cultivo; sin embargo, presenta la desventaja de requerir un largo tiempo de incubación, por lo que es urgente implementar nuevas técnicas de diagnóstico o mejorar las actuales con el fin de detectar a tiempo los casos de TB para que sean tratados oportunamente y, de esta manera, limitar la transmisión de la enfermedad.

El ensayo ELISpot (*Enzime-Linked ImmunoSpot*) es una técnica inmunológica que permite conocer el número de células productoras de una citocina secretada en respuesta a un antígeno específico. Esta técnica puede ser empleada para el diagnóstico de TB utilizando antígenos específicos de *M.tuberculosis*, como el antígeno de secreción temprana de 6 kilodalton (ESAT-6, *Early Secretory Antigen Target 6 KDa*) y la proteína del filtrado de cultivo de 10 KDa (CFP-10; *Culture Filtrate Protein 10 KDa*) para determinar si las células mononucleares de sangre periférica

del individuo ya habían estado en contacto con los antígenos de *M.tuberculosis* y los reconocen.

Diversos autores han reportado que las células mononucleares de los pacientes con TB pulmonar presentan mayor número de células mononucleares productoras de IFN- γ al ser estimuladas con antígenos específicos de *M.tuberculosis*, en comparación con el número de células productoras de esta citocina en individuos sanos. A pesar de que la sensibilidad y la especificidad del ensayo de ELISpot para IFN- γ son altas, esta determinación no detecta al 100% de los pacientes con infección latente de TB (LTBI: *Latent Tuberculosis Infection*), por lo que se han buscado nuevos biomarcadores de la infección, como la IL-2, que es secretada por los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados por los antígenos peptídicos de la micobacteria.

El IFN- γ y la IL-2 son citocinas que caracterizan a la respuesta tipo Th1 antígeno-específica, por lo que éstas también se han utilizado en el estudio de otras infecciones, como la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), en la que estudios han reportado que el uso de la técnica de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 ha sido de gran beneficio en el seguimiento de la respuesta inmunológica de estos pacientes. En la TB aún no se ha utilizado esta determinación dual, por lo que en este trabajo se evaluó si la técnica de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 es útil para diferenciar a los pacientes con TB pulmonar activa de los voluntarios sanos, de tal forma que el diagnóstico sea oportuno y así disminuir la alta prevalencia de la enfermedad.

MARCO TEÓRICO

I.- Generalidades sobre la Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. La OMS ha considerado a esta infección como uno de los problemas de salud más graves a nivel mundial a pesar de ser curable y de que se puede prevenir. Esta enfermedad infecciosa compromete principalmente a los pulmones, causando la TB pulmonar; sin embargo, también puede afectar a otros órganos (TB extrapulmonar) [1]. La OMS reportó en su informe anual del 2013 que un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo tuberculoso, pero se considera que sólo el 10% desarrollará TB activa en algún momento de su vida y el 90% restante permanecerán infectados sin desarrollar síntomas, estado conocido como infección latente de TB (LTBI) [2].

La infección se adquiere por contagio de persona a persona. Cuando un paciente con TB pulmonar activa tose o estornuda y libera los bacilos al ambiente, éstos ingresan al tracto respiratorio de otro individuo y viajan hasta llegar a los alvéolos, donde infectan a los macrófagos y células dendríticas residentes en el pulmón [3, 4]. Si la persona está inmunocomprometida (por ejemplo, en la infección con VIH, malnutrición, uso de esteroides u otros medicamentos inmunosupresores) desarrollará TB pulmonar activa [5], pero si el sistema inmunológico se activa eficientemente, las micobacterias permanecen en estado latente sin desarrollar la enfermedad [3, 4].

La infección progresa a TB activa cuando se presenta un desequilibrio en la respuesta inmunológica de la persona infectada, lo cual favorece el incremento en el metabolismo de la bacteria, permitiéndole replicarse e infectar a más células del hospedero. Entre los principales factores de riesgo asociados a la TB se encuentran enfermedades como la diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, la infección por VIH, el cáncer, la terapia para enfermedades autoinmunes y otros factores como son la malnutrición, el alcoholismo y la drogadicción. Además, se han descrito defectos

genéticos en el eje IL-12/IL-23/IFN γ , el cual juega un papel importante en la activación de las células del sistema inmunológico involucradas en la generación de una respuesta contra *M.tuberculosis* y otras infecciones por bacterias intracelulares [6].

Los pacientes que progresan a TB pulmonar activa generalmente presentan signos y síntomas como tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna [1]. Cuando un individuo está infectado con *M.tuberculosis* y se encuentra en estado latente, no presenta síntomas, pero la prueba intradérmica de la tuberculina (TST: *Tuberculin Skin Test*) resulta positiva, indicando que hubo una primoinfección en el individuo. Dependiendo del diagnóstico que el médico determine, el paciente con TB pulmonar activa debe recibir tratamiento antituberculoso, mientras que el paciente con LTBI debe recibir tratamiento dentro de los primeros seis meses después de haber adquirido la infección para reducir las posibilidades de que la enfermedad se manifieste [7].

En la actualidad, los medicamentos antituberculosos se clasifican en fármacos de primera y segunda línea. Entre los de primera línea se encuentran la isoniazida, rifampicina, estreptomycin, pirazinamida y ethambutol, éste último con actividad bacteriostática. Los medicamentos de segunda línea incluyen a las quinolonas, capreomicina, protionamida, etionamida, kanamicina y riabutina (todos éstos con actividad bactericida), el ácido paraaminosalicílico, cicloserina, clofasimina y macrólidos (con actividad bacteriostática) [8, 9]. El tratamiento puede durar entre seis y nueve meses [7], y debido al tiempo prolongado, a veces el paciente no tiene apego al tratamiento o lo abandona, lo cual es clave para que la micobacteria adquiera resistencia a los medicamentos, o al menos a dos de los fármacos de primera línea (isoniazida y rifampicina), dando origen a los pacientes multifármaco-resistentes (MDR) [2].

Actualmente la única vacuna disponible para proteger de la TB es la BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), cuya producción es mediante el liofilizado de una cepa viable de *Mycobacterium bovis* atenuada, que se aplica en los primeros meses de vida, sin

embargo, su eficacia contra la TB pulmonar es muy baja [10]. Es por eso que los investigadores siguen estudiando esta enfermedad, diseñando vacunas nuevas que logren inmunizar a los individuos contra esta infección y planeando estrategias para el control de la TB [11].

II.- Estadísticas actuales de la Tuberculosis

La OMS reportó que en el 2012 se presentaron 8.6 millones de casos nuevos de TB (aproximadamente 530 000 casos en niños y 2.9 millones en mujeres) y 5.7 millones de casos recurrentes en pacientes con tratamiento [2]. El 13% de los casos nuevos de TB (1.1 millones) ocurrieron en personas con VIH, los cuales se presentaron con mayor frecuencia en África (Figura 1). Después de la inmunodeficiencia causada por el VIH que lleva al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, la TB es la segunda causa de muerte de origen infeccioso. Se reportó también que en el mismo año, 1.3 millones de muertes ocurrieron por esta enfermedad, de las cuales aproximadamente 74 000 ocurrieron en niños entre 0 y 15 años de edad [1, 2].

Geográficamente, las zonas con mayor índice de TB son Asia (58%) y África (27%) [1, 2]. En México se presentaron 15,918 casos de TB pulmonar en el año 2012, predominantemente en el sexo masculino entre los 18 y 49 años de edad. El 21% del total de estos casos se vinculan con diabetes mellitus y 4% con VIH/SIDA, entre otras [2]. Los estados donde se ha registrado un mayor número de casos de TB son Baja California, Veracruz y Chiapas [12]. Ya que en México se están incrementando los casos de obesidad y diabetes mellitus, la susceptibilidad a adquirir la infección con *M.tuberculosis* sigue esta misma tendencia, por lo que la preocupación por vigilar y estudiar la TB se ha vuelto prioritaria para el sistema de salud.

Estimated TB incidence rates, 2012

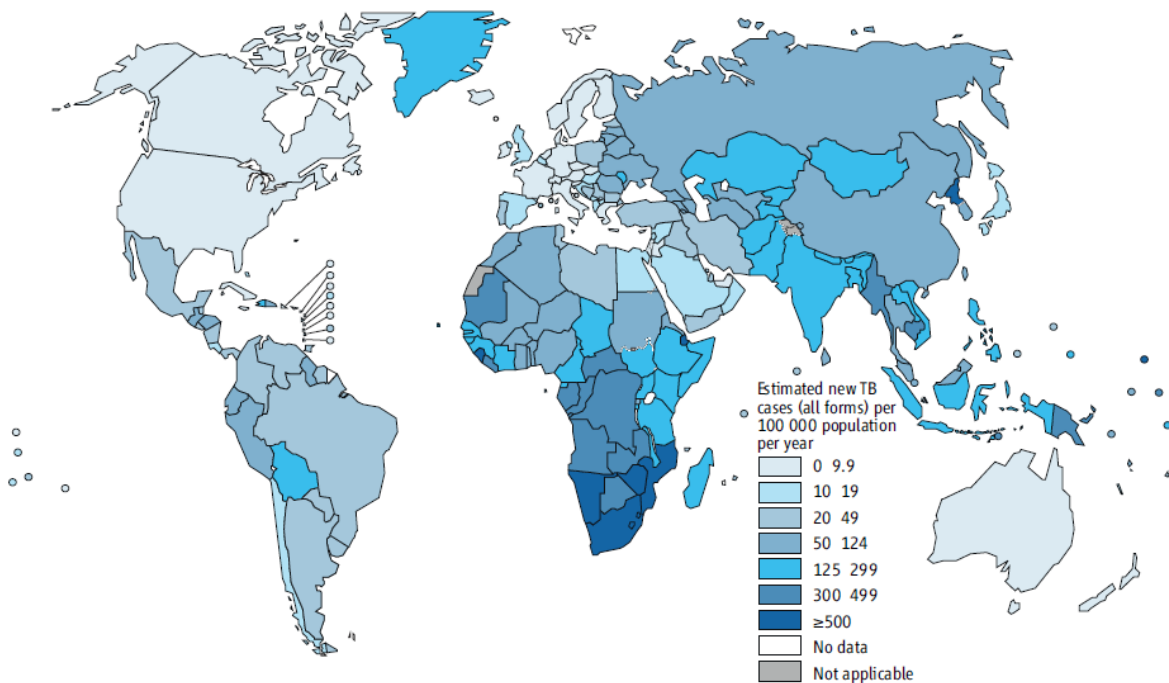


FIGURA 1. Incidencia mundial de nuevos casos de todas las formas de TB estimada por cada 100 000 habitantes. La OMS estimó 8.6 millones de casos nuevos de TB en el año 2012. La mayoría de los casos ocurrieron en Asia (58%), seguido de África (27%), la región mediterránea del este (8%), la región Europea (4%), y finalmente América (3%). [WHO, 2013]

Los pacientes con TB activa pueden causar infección latente entre el 20 y el 30% de los contactos cercanos. De esta población, aproximadamente el 5% desarrollará TB activa [3]. Un paciente que no recibe tratamiento antituberculoso puede infectar entre 10 y 15 personas en sólo un año. Por esto, los esfuerzos se han centrado en interrumpir la cadena de transmisión mediante una búsqueda intencionada de personas con LTBI para que reciban tratamiento oportuno y que se fortalezca el control de la enfermedad. El factor esencial para el control de la expansión de esta enfermedad radica en la capacidad de diagnosticarla de manera temprana y dar el tratamiento a los enfermos.

III. Características generales de *Mycobacterium tuberculosis*

M.tuberculosis es el agente causal más frecuente de TB. Esta bacteria también se conoce como bacilo de Koch, en honor a Robert Koch, quien la describió por primera vez en el siglo XVII. Este agente infeccioso es parte del complejo *M.tuberculosis*, que incluye a las especies *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti* y *M.canettii* [4].

a) Propiedades morfológicas y de crecimiento

M.tuberculosis es un bacilo intracelular, inmóvil, no esporulado, mesofílico, cuyo tamaño va de 2 a 4 μm de longitud por 0.2 a 0.5 μm de ancho. Para su crecimiento *in vitro* requiere medios selectivos sólidos como: Lowenstein Jensen, 7H10 y 7H11 y líquidos como: Cohen Middlebrook 7H9. El tiempo que la bacteria requiere para dividirse va de 15 a 20 horas, por lo que su crecimiento es lento y requiere que los cultivos se incuben durante 21 días a 37°C, en un ambiente aeróbico, con 5% CO₂. Cuando las micobacterias ya han crecido en el medio de cultivo sólido, se observan colonias grandes, con un tamaño aproximado entre 2 y 5 mm de diámetro, de color amarillo claro, con bordes irregulares y aspecto granular [13, 14].

M.tuberculosis presenta una pared celular formada por 40% de lípidos, entre los que destacan las ceras D, glucolípidos, triglicéridos, sulfolípidos y lipoproteínas. Básicamente es una estructura formada por dos tipos de polímeros, el peptidoglicano y el arabinogalactano. A esta estructura se le unen los ácidos micólicos, que a su vez sostienen a otros glicolípidos. La pared celular también contiene lipoarabinomano (LAM), el cual favorece la interacción entre el patógeno y la célula hospedera, facilitando la supervivencia de *M.tuberculosis* dentro de los macrófagos [13] (Figura 2a).

Esta compleja composición química es la que le confiere la característica de resistir la desecación, que su crecimiento sea lento, que la bacteria sea altamente hidrofóbica, que sea resistente a algunos antibióticos y además que sea resistente a

la tinción con colorantes simples. Por lo tanto, para visualizar a las micobacterias en el microscopio se emplean tinciones como la de Ziehl-Neelsen (Figura 2b), en la que se observan bacilos cortos de color rosa [13, 14], la tinción de Kinyoun y la de auramina-rodamina. Debido a esa capacidad de resistir a la decoloración, a las micobacterias también se les conoce como bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) [4].

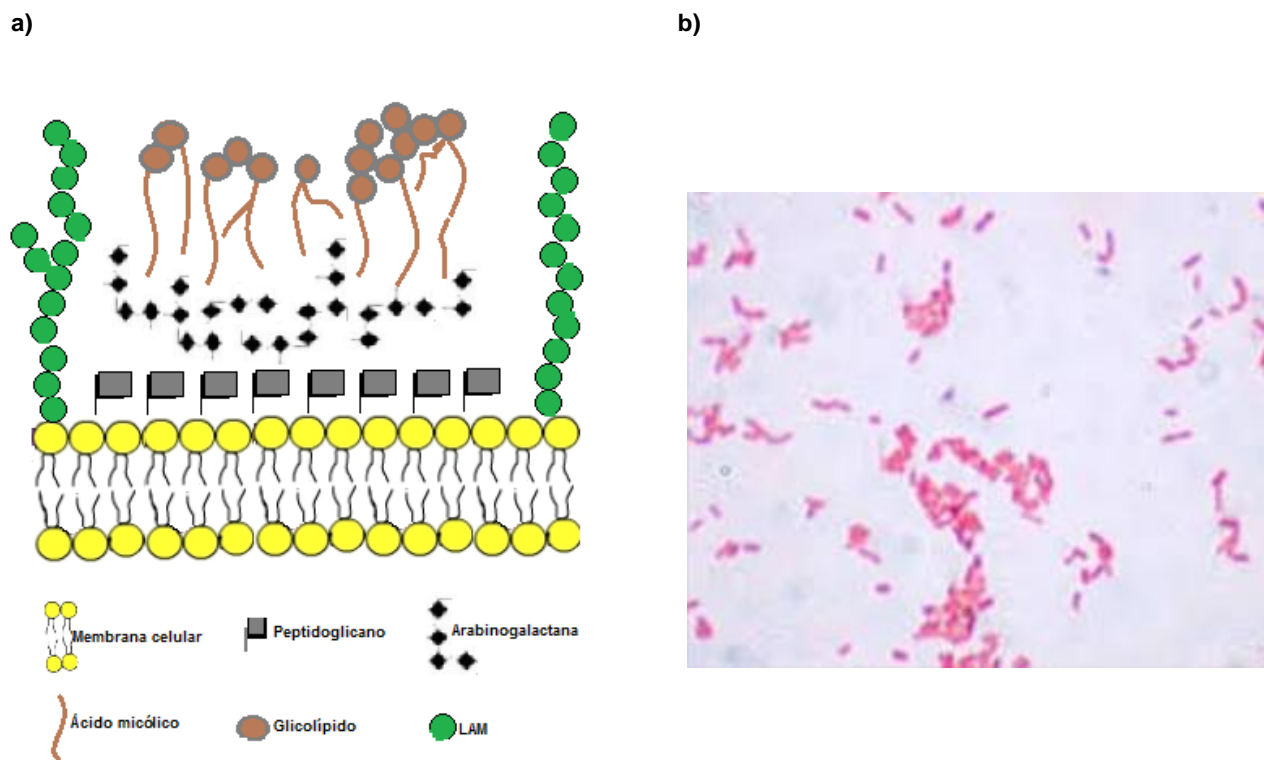


FIGURA 2. Características de las micobacterias. La pared celular de *M.tuberculosis* le confiere resistencia a la decoloración con alcohol ácido. En el inciso **a** se presenta la estructura de la pared celular, y en el inciso **b** se muestra una imagen al microscopio de los BAAR después de la tinción de Ziehl-Neelsen. [Irene Latorre Rueda, 2011]

b) Antígenos específicos

Con el avance en la biología molecular, se lograron descubrimientos importantes en cuanto al conocimiento del genoma de *M.tuberculosis*, que se conforma por 16 regiones de diferenciación (RD: *region of difference*) (Figura 3), de las cuales, la región RD-1 juega un papel importante en la virulencia de la bacteria, ya que esta región está presente únicamente en las cepas patógenas de *M.tuberculosis* y *M.bovis*, y no está presente en el genoma de *M.bovis* BCG, que es una micobacteria atenuada [10, 13, 15]. Entre los principales antígenos codificados por la región RD-1 se encuentran el antígeno de secreción temprana (ESAT-6; *Early Secretory Antigen Target 6 KDa*) y el filtrado de proteínas del cultivo (CFP-10; *Culture Filtrate Protein 10 KDa*), que son codificados por los genes Rv3874 y Rv3875 respectivamente, y que se secretan en dímeros en una relación 1:1 [16, 17].

Se ha logrado obtener y purificar los antígenos micobacterianos ESAT-6 y CFP-10 para utilizarlos en los modelos de infección con *M.tuberculosis in vitro*. Ambos antígenos son reconocidos por las células del hospedero, las cuales se activan e inician la liberación de IFN- γ , generando así una respuesta específica de tipo Th1.

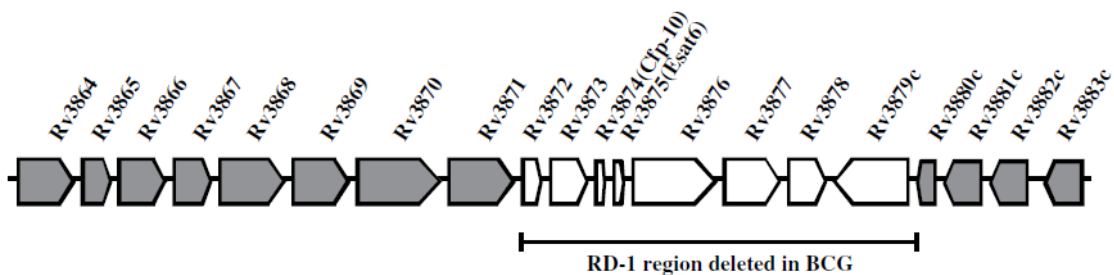


FIGURA 3. RD-1 (Region of Difference-1) en *M.tuberculosis*. La región RD-1 contiene los genes que codifican para los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10. Estudios han demostrado que esta región le confiere virulencia a las bacterias, ya que no se encuentra en cepas atenuadas, como *M.bovis* BCG. [Niladri Ganguly, 2008]

IV. RESPUESTA INMUNOLÓGICA HACIA *Mycobacterium tuberculosis*

a) Receptores que participan en el reconocimiento de *M.tuberculosis*.

Una vez que *M.tuberculosis* entra a las vías respiratorias altas, la micobacteria evade las barreras físicas y químicas, como son los cilios, las mucosas y la secreción de productos solubles como las defensinas, y se establece en los alveolos pulmonares, donde los macrófagos y las células dendríticas residentes (conocidas como APC: *Antigen Presenting Cells*) reconocen a *M.tuberculosis* o sus componentes a través de receptores relacionados a patógenos (PRR, *Pathogen Recognition Receptors*). Los PRR incluyen a los receptores tipo Toll (TLRs; *Toll-like receptors*), receptores NLR (*Nucleotide-binding oligomerization domain-(NOD-) like receptors*), lectinas tipo C (que incluyen al receptor de manosa CD207, molécula intracelular específica a células dendríticas (DC-SIGN) y Dectina-1), los receptores del complemento, receptores scavenger, receptores de proteína surfactante A (Sp-A) y receptores de colesterol. [4, 18]. Los macrófagos reconocen a *M.tuberculosis* para internalizarla y degradarla, a través de los receptores de manosa y de complemento, mientras que las células dendríticas lo hacen mediante los DC-SIGN [23]. Por otra parte, las APC poseen TLR que reconocen a la bacteria a través de su unión con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) cuya interacción induce una respuesta proinflamatoria [4].

Los ligandos de superficie de la micobacteria que interactúan con los TLRs incluyen a las lipoproteínas y glicolipoproteínas. Esta interacción resulta en la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B y la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), las Interleucinas IL-1 e IL-12, así como la producción de quimiocinas y de óxido nítrico. Esta producción es un proceso regulado por el sistema inmunológico, ya que es preciso evitar que ocurra una inflamación excesiva que dañe a los tejidos del hospedero. Esta regulación ocurre a través de una familia de receptores de tirosin-cinasa Tyro3/Axl/Mer (TAM),

que actúan mediante un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a la unión del TLR con su ligando, así como a la producción de citocinas [4]. Otro mecanismo que regula el proceso de inflamación es la producción de citocinas antiinflamatorias, como la IL-4, IL-9 e IL-10. Un estudio *in vitro* demostró que las células de pacientes con TB pulmonar obtenidas a partir de lavado bronqueoalveolar, al ser infectadas con *M.tuberculosis* H37Ra, producen IL-4 en concentraciones significativamente mayores en comparación con voluntarios sanos [19]. Estos procesos fisiológicos han sido aprovechados por *M. tuberculosis* para persistir en el hospedero.

b) Endocitosis y presentación de antígenos peptídicos a los Linfocitos T

La endocitosis es el mecanismo por el cual la micobacteria es internalizada en las APC para ser degradada. Este proceso inicia con la invaginación de la membrana citoplasmática alrededor del bacilo formando una vacuola fagocítica, la cual puede madurar hasta su unión con el lisosoma, dando lugar al fagolisosoma. Esta estructura se forma en un corto tiempo que depende del antígeno fagocitado, siendo en la mayoría de los casos de 30 minutos. Para realizar esa fusión se requiere la participación de algunas proteínas como las anexinas (las cuales se enlazan a fosfolípidos de una manera dependiente de calcio) y las GTPasas rab5, rab7 y rab1 (que se asocian secuencialmente a los fagosomas dependiendo de su estado de madurez). Así, la presencia de rab5 en un fagosoma permite su fusión con endosomas que también contienen rab5, y lo mismo sucede con rab7 y rab1. La fusión del fagosoma con el lisosoma ocasiona un cambio en las condiciones intravacuolares, tales como la disminución del pH [20], la presencia de moléculas como las catepsinas H y S (enzimas características de endosomas tempranos y tardíos, respectivamente), y la presencia de enzimas como hidrolasas, proteasas, lisozimas, etc. que en conjunto, degradarán a las micobacterias [21].

Las células dendríticas infectadas maduran y se dirigen a los nódulos linfáticos cercanos, donde llevarán a cabo la presentación de los antígenos peptídicos a los

linfocitos T naive [4]; mientras que los macrófagos residentes que han fagocitado a las micobacterias secretan citocinas, como CCL2, CXCL1, IL-8, etc. para atraer a otras células al sitio de la infección. En los nódulos linfáticos, las células dendríticas realizan la presentación de los antígenos peptídicos a través de moléculas especializadas que son codificadas por genes presentes en un *locus* denominado complejo principal de histocompatibilidad (MHC: *Major Histocompatibility Complex*), de las cuales existen dos tipos: las moléculas MHC de clase I (que presentan antígenos intracelulares) y las de clase II (que realizan la presentación de antígenos exógenos). Las primeras presentan los péptidos a los linfocitos TCD8+ y las segundas a los linfocitos TCD4+ [21]. Dado que *M.tuberculosis* es un antígeno exógeno, la presentación de los péptidos micobacterianos ocurre a través de moléculas MHC de clase II, sin embargo, también puede ocurrir a través de moléculas de clase I, proceso conocido como presentación cruzada. La presentación de los péptidos de la micobacteria a los linfocitos T en los nódulos linfáticos favorece su activación y a su vez son atraídos por las citocinas liberadas por los macrófagos que fueron activados en el sitio de infección. Otras células que llegan a este sitio incluyen fibroblastos y células gigantes multinucleadas, que se agrupan alrededor de los macrófagos infectados con el fin de contener la infección, dando origen a una estructura celular conocida como granuloma, donde se mantiene un ambiente hipóxico, hay una disminución del pH y se liberan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [3, 22]. A la vez, los macrófagos también presentan los antígenos peptídicos a los linfocitos T CD4+ que han llegado al sitio de la infección a través de moléculas de MHC clase II, para activarlos y generar una respuesta inmunológica contra *M.tuberculosis* [4, 23].

Las moléculas MHC de clase II se sintetizan y ensamblan en el retículo endoplásmico en una estructura inestable de dos cadenas, α y β . Para estabilizar a la recién formada molécula MHC II se requiere la cadena invariante Ii, que a su vez bloquea el sitio para la unión del péptido. Este complejo pasa a través del aparato de Golgi y sale al citosol para unirse al fagolisosoma, cuyo contenido en hidrolasas favorece la degradación parcial de la cadena Ii para dar origen al péptido CLIP (*CLass-II-associated Invariant chain Peptide*). Por afinidad, CLIP es removida por la

molécula HLA-DM de tal forma que el sitio donde se unirá el péptido queda libre [24]. En consecuencia, un péptido de 10-30 aminoácidos es ensamblado en el sitio correspondiente y éste complejo es transportado hacia la superficie de la APC donde se lleva a cabo la presentación a los linfocitos T CD4+.

Los linfocitos T reconocen al antígeno peptídico a través de su receptor (TCR), que es la primera señal para la activación de linfocitos T. Además de ésta, se requiere una segunda señal de activación, en la cual participan las moléculas coestimuladoras CD28 y CD40L que se unen a sus ligandos CD80 y CD40, respectivamente [24]. La interacción de las moléculas de MHC al TCR desencadena una cascada de señales intracelulares que culmina en la generación de una respuesta proinflamatoria (Figura 4).

c) Respuesta inmunológica celular

Dentro de las 2 a 8 semanas siguientes a la infección por *M.tuberculosis* se genera una respuesta inmunológica celular que depende principalmente de los linfocitos T [4, 25]. Diversos estudios han demostrado que los linfocitos T CD4+ juegan un papel muy importante en la defensa contra *M.tuberculosis* y otros patógenos intracelulares, pues en pacientes infectados con VIH, donde el número de linfocitos T CD4+ es menor a los valores de referencia, el control de la TB es deficiente [3]. Se ha reportado que los pacientes con VIH y TB presentan infiltración granulocítica en el sitio de la lesión y una necrosis mayor en comparación con sujetos sin infección por VIH [25].

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados secretan citocinas, como el IFN- γ , el cual interacciona con su receptor en el macrófago. La unión del IFN- γ con su receptor favorece la activación del macrófago para que este último lleve a cabo la muerte de *M.tuberculosis*. Los procesos que describen la activación del macrófago son la maduración del fagosoma [18], la producción de péptidos antimicrobianos, como la catelicidina LL-37 [26], la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

[27], la transcripción de NEMO (*NF- κ B Essential Modulator*) [6] y la producción de citocinas, que son proteínas de bajo peso molecular secretadas por las células activadas en respuesta a un antígeno específico [13], que pueden modular el microambiente con el fin de generar una respuesta celular tipo Th1 o tipo Th2.

En la infección por *M.tuberculosis* las principales citocinas liberadas son TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-15, IL-2 e IFN- γ [28]. Los macrófagos y células dendríticas producen TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-15; los linfocitos T (CD4+ y CD8+) producen IL-2 e IFN- γ , y las NK activadas también producen IFN- γ (Figura 4). El IFN- γ es una citocina característica de la respuesta celular tipo Th1 [5, 29]. Sus funciones principales son la activación de los macrófagos para favorecer el procesamiento y presentación antigénica, el reclutamiento de leucocitos al sitio de la infección, incrementar la actividad de las células NK, regular la actividad de los linfocitos B para la síntesis de inmunoglobulinas, aumentar la síntesis de las moléculas MHC de clase I y de clase II, y actuar junto con TNF- α para estimular la producción de la óxido nítrico sintetasa inducible (NOS-2), que es la enzima responsable de la síntesis del óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que actúan en contra de *M.tuberculosis* [31,32].

En diferentes estudios se ha demostrado que el IFN- γ es muy importante en la generación de una respuesta inmunológica generada contra *M.tuberculosis* [3, 6]. Por ejemplo, en un estudio se discutió que el Síndrome de Susceptibilidad Mendeliana a las Infecciones Micobacterianas (MSMD: *Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases*) ocasionado por defectos en la inmunidad mediada por IFN- γ , aumenta la susceptibilidad de los pacientes a adquirir infecciones por bacterias de los géneros *Mycobacterium* y *Salmonella*, y se sabe que es común que los pacientes con MSMD presenten TB localizada o diseminada a causa de la aplicación de la vacuna de *M.bovis* BCG. Los defectos más comunes en el MSMD son mutaciones en genes que codifican para la subunidad β 1 del receptor de IL-12 (citocina secretada por los macrófagos infectados) la cual induce la producción de IFN- γ , mutaciones en genes que codifican para el receptor de IFN- γ , mutaciones en el gen que codifica

para STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1*) que es una molécula que participa en la señalización intracelular para activar al linfocito T, y mutaciones en NEMO, molécula intracelular que favorece la activación de NF- κ B [6].

Por otro lado, la IL-2 es una citocina de tipo Th1 con diferentes funciones, entre las que se mencionan la inducción de la proliferación de los linfocitos T, incrementar la actividad citolítica de las células NK, favorecer el desarrollo de los linfocitos T reguladores, inducir la proliferación de linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas, e incrementar la expresión de los receptores para la IL-2 [33]. Los linfocitos T de memoria central producen mayores concentraciones de IL-2, por lo que algunos autores han estudiado la producción de esta interleucina en conjunto con el IFN- γ (que es una citocina producida por linfocitos T efectores) para identificar a los pacientes que han adquirido LTBI recientemente [34, 35].

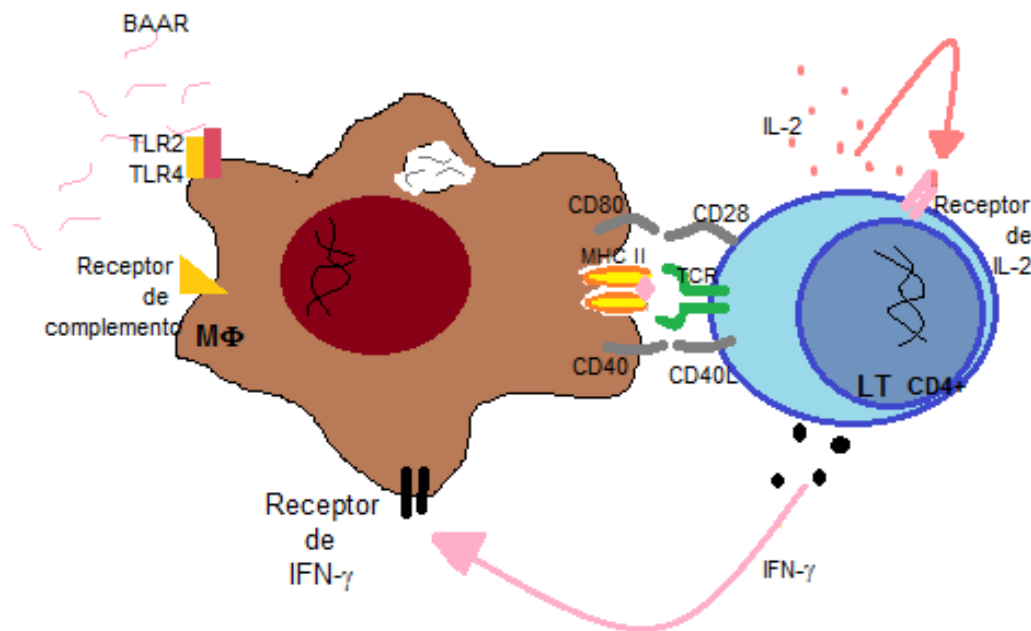


FIGURA 4. Sinapsis inmunológica entre una célula presentadora de antígeno y un linfocito T. *M. tuberculosis* es reconocida por las células del hospedero a través de receptores como los receptores tipo Toll, e internalizada mediante receptores de manosa. Las micobacterias se internalizan en las APC dentro de vesículas fagocíticas que se unen a los lisosomas para ser degradadas. Los antígenos peptídicos que resultan de esta degradación son acoplados a moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC II) a través de las cuales son presentados a los linfocitos T CD4+, quienes se activan e inician la producción de IFN- γ (para activar a los macrófagos y favorecer la fagocitosis) e IL-2 (para favorecer la proliferación de los linfocitos T).

V. DIAGNÓSTICO PARA TUBERCULOSIS.

Entre los métodos que se utilizan para el diagnóstico de la TB se encuentran los bacteriológicos (baciloscopía y cultivo), los serológicos (ELISA para buscar anticuerpos contra antígenos de *M.tuberculosis*), los ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs; *Interferon-gamma Release Assay*) y los métodos de biología molecular (como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [14, 18].

I. Baciloscopía y cultivo de esputo

La baciloscopía y el cultivo a partir de muestras del esputo del paciente siguen siendo los métodos diagnósticos de referencia porque el resultado es confiable; sin embargo, presentan desventajas con respecto a otros métodos, por ejemplo, el tiempo que se requiere para dar un resultado utilizando el cultivo es hasta de 21 días. Para realizar la baciloscopía se toma una muestra de esputo del paciente, la cual se trata con N-acetil cisteína e hidróxido de sodio para eliminar el moco, posteriormente se realiza un frotis sobre un portaobjetos y se tiñe por el método de Ziehl-Neelsen, para detectar la presencia de los bacilos micobacterianos, los cuales resisten la decoloración, de tal forma que la micobacteria retiene el color de la fucsina, observándose al microscopio en forma de bacilos cortos de color rosa [13, 14]. El número de BAAR observados en los frotis teñidos se reporta con cruces que va desde 1+ (1 a 9 bacilos observados en 100 campos), hasta 3+ (más de 10 bacilos por campo, en 20 campos) [36].

Por otro lado, a partir de la muestra de esputo también se realiza el cultivo en los medios selectivos para *M.tuberculosis*, como Lowenstein Jensen, dejando un tiempo de incubación de 21 días a 37 °C y 5% CO₂. Si al cabo de este tiempo se observa crecimiento micobacteriano, entonces se reporta como cultivo positivo y se asume que el individuo tiene TB activa [13]. La baciloscopía y el cultivo no sólo se realizan como método diagnóstico de la TB, sino que también se realizan cada mes como

parte de la vigilancia que el médico realiza a los pacientes con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento y/o la evolución del paciente.

II. Prueba de la tuberculina

Actualmente se realiza la prueba de la tuberculina (TST: *Tuberculin Skin Test*) para identificar si las células del individuo reconocen a los antígenos micobacterianos y son capaces de generar una respuesta inmunológica. Esta técnica también se conoce como prueba del PPD (*Protein Purified Derivative*), donde las proteínas micobacterianas se obtienen de un cultivo de *M.tuberculosis*. Finalmente el producto contiene más de 200 antígenos peptídicos de micobacterias [4, 18].

La prueba de la tuberculina consiste en la aplicación intradérmica de 5 unidades de PPD (TUBERSOL, Sanofi Pasteur 5UT/0.1 ml) en la cara anterior del antebrazo (Figura 5a), y entre 48 y 72 h después de la aplicación se observa el sitio de aplicación. Si se aprecia una induración cuyo diámetro es igual o mayor a 10 mm el resultado es positivo (Figura 5b). En recién nacidos, en niños menores de cinco años y enfermos con desnutrición y/o inmunodeficiencia, el criterio de positividad es una induración de 5 mm de diámetro [2, 37]. Desafortunadamente esta prueba no es confiable debido a que se ha demostrado que existe reacción cruzada, es decir, que un resultado positivo al PPD no indica que la infección es por *M.tuberculosis*, sino que podría ser causada por otras micobacterias no tuberculosas (MOT), o por el reconocimiento de *M.bovis BCG* utilizada en la vacunación [38]. Debido a la reactividad cruzada del PPD, ha sido necesario definir otros antígenos que nos permitan reconocer de manera específica al agente causal de la TB. Frente a esta problemática, se han desarrollado técnicas de inmunodiagnóstico que utilizan antígenos específicos de *M.tuberculosis*, como ESAT-6 y CFP-10 [15].

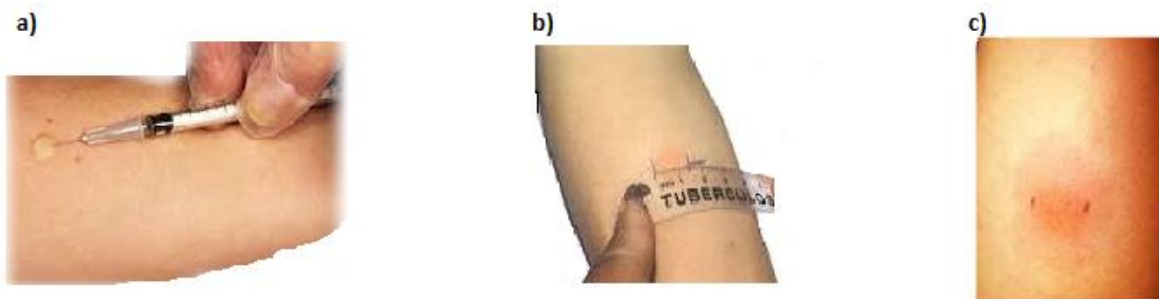


FIGURA 5. Aplicación y lectura del PPD. La prueba del PPD (o prueba de la tuberculina) se realiza para identificar primoinfección con *M.tuberculosis*, sin embargo, dista de plena confianza debido a la reacción cruzada que existe con micobacterias ambientales y con *M.bovis BCG* aplicada en la vacunación. **a)** Aplicación intradérmica del filtrado proteico purificado. **b)** Lectura del diámetro de la induración observada después de 48-72h. **c)** Induración formada por hipersensibilidad tipo IV en respuesta a las proteínas del derivado proteico purificado. [<http://ethnomed.org/clinical/tuberculosis/firland/latent-tb-faqs>].

III. Pruebas inmunológicas: IGRAs

Actualmente, los IGRAs se están utilizando con mayor frecuencia en el diagnóstico de TB debido a su alta sensibilidad y especificidad [30]. Estos ensayos se basan en la detección y/o cuantificación del IFN- γ producido por las células NK y linfocitos T (CD4+ y CD8+) en respuesta a antígenos específicos de *M.tuberculosis*, como ESAT-6 y CFP-10. Existen dos técnicas disponibles: QuantiFERON - TB Gold In - Tube (QFT-TB) y Enzyme-linked Immunospot (T-SPOT.TB); el primero se utiliza para cuantificar la concentración de IFN- γ liberado por las células mononucleares en respuesta a ESAT-6 y CFP-10, y en el segundo se determina el número de células mononucleares que producen IFN- γ en relación al número de células que se colocan en cada pozo (frecuencia de células productoras de IFN- γ) [38, 39].

La técnica de ELISpot (*Enzyme-linked Immunospot*) se desarrolló originalmente para la detección de células B secretoras de anticuerpos antígeno-específicos. Este ensayo ha sido adaptado para determinar el número de células productoras de una o varias citocinas en respuesta a diferentes antígenos específicos debido a su alta sensibilidad y a sus ventajas con respecto a los métodos tradicionales de diagnóstico,

como la baciloscopía, el cultivo del esputo del paciente, la prueba de la tuberculina y la detección de ácidos nucleicos de la micobacteria en muestras de pacientes. Las principales aplicaciones son la evaluación de la eficacia del tratamiento contra distintas infecciones y de nuevas vacunas, en pacientes con trasplantes y en el seguimiento de la evolución de pacientes con enfermedades autoinmunes e infecciosas (como el caso de VIH y la TB) [40].

El ensayo de ELISpot sigue el principio de la técnica de ELISA tipo sándwich, en la cual las placas de PVDF (*polyvinylidenedifluoride*) se sensibilizan con los anticuerpos de captura específicos para las citocinas en estudio, luego se realiza un lavado con PBS para eliminar los anticuerpos de captura que no se fijaron en la placa y después se bloquean los sitios donde no hubo adhesión de éstos utilizando una proteína, como la Albúmina Sérica Bovina, con el fin de evitar el pegado inespecífico. En seguida se colocan las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes en presencia de los estímulos específicos (ESAT-6 y CFP-10). Las placas se mantienen en incubación para permitir que las células que reconocen a los antígenos específicos se activen y secreten las citocinas a la vecindad inmediata para unirse específicamente a los anticuerpos de captura. Entonces, las células son removidas completamente, se lava la placa con PBS y luego se colocan los anticuerpos de detección. Para el caso de la técnica de ELISpot dual del sistema manufacturado por Abcam (Cambridge), el anticuerpo de detección para IFN- γ está conjugado a FITC, mientras que el anticuerpo de detección para IL-2 está biotinilado. De esta forma, el siguiente paso es adicionar las enzimas HRP (*Horse radish peroxidase* conjugada al anticuerpo anti-FITC) y AP (*Alkaline Phosphatase* conjugada a avidina) para que se unan por afinidad a FITC y a la biotina, respectivamente. Posteriormente se adicionan los sustratos para las enzimas, colocando uno a la vez. El 3-Amino-9-Etil-Carbazol (AEC) es el sustrato de la enzima HRP y se observan precipitados (llamados *spots*) de color rojo, mientras que el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolilfosfato *p*-Toluidino y Cloruro de Nitro Azul Tetrazolio (BCIP/NBT) es el sustrato para la AP y genera precipitados de color azul (Figura 6) [41].

R&D Systems también manufactura ELISpot dual para IFN- γ e IL-2. En este sistema, las placas ya vienen sensibilizadas con el anticuerpo de captura listas para adicionar las células mononucleares de sangre periférica y los antígenos; luego se incuban para permitir que las células liberen las citocinas y se unan a los anticuerpos de captura, y posteriormente se realice el proceso de revelado adicionando el anticuerpo biotinilado de detección para IFN- γ y el anticuerpo de detección para IL-2, que está conjugado a la enzima HRP. Por lo tanto, al adicionar los sustratos (AEC para la enzima HPR y BCIP/NBT para la PA), los precipitados que manifiestan la presencia de IFN- γ son de color azul, mientras que los precipitados color rojo corresponden a IL-2 [40]. Antes de contar los *spots* en un lector de ELISPOT, se debe dejar secar la membrana completamente para evitar un resultado falso positivo.

La técnica de ELISpot dual ya se ha utilizado en pacientes con VIH, cuyos estudios han demostrado que es una metodología útil en el seguimiento de la evolución de los pacientes con esta infección [42]. Con estos antecedentes de la metodología dual, y considerando que el IFN- γ y la IL-2 son liberadas por las células mononucleares antígeno-específicas a *M.tuberculosis*, nosotros estudiamos si es útil para diferenciar a los pacientes con TB pulmonar de los voluntarios sanos.

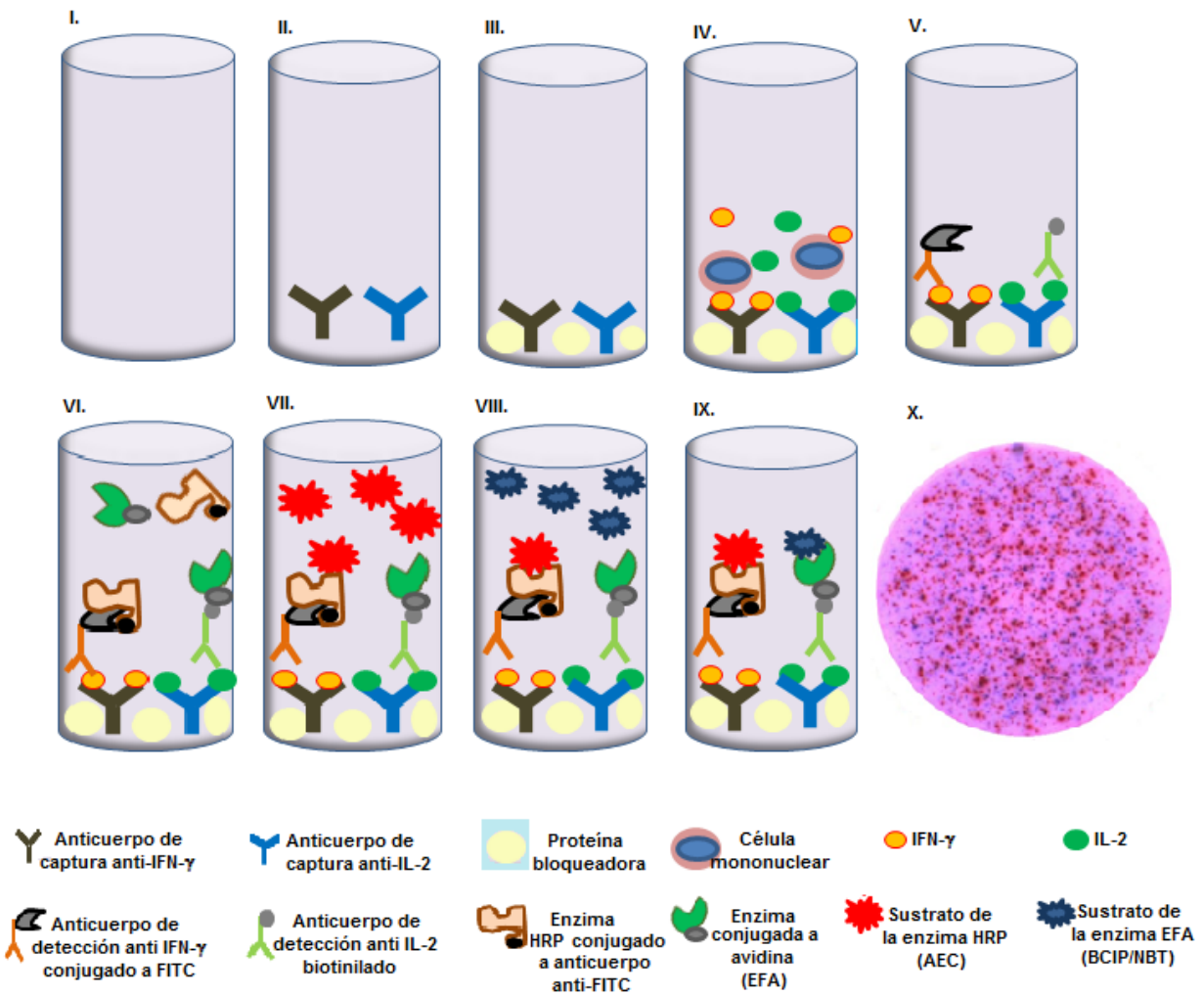


FIGURA 6. Procedimiento de la técnica de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (Abcam, Science Park, Cambridge). **I)** Esta técnica se realiza en placas de 96 pozos de PVDF. **II)** Las placas se sensibilizan con los anticuerpos de captura anti-IFN- γ y anti-IL-2. **III)** Se adiciona una proteína (como la albúmina sérica bovina) para bloquear los sitios donde no hubo adhesión de los anticuerpos de captura, para evitar el pegado inespecífico. **IV)** Se colocan las células mononucleares de sangre periférica del paciente en presencia de los estímulos específicos de *M.tuberculosis*, ESAT-6 y CFP-10, y se incuban durante 20h a 37°C y 5% CO₂ para permitir que las células que responden a los antígenos liberen las citocinas a la vecindad inmediata y que éstas se unan específicamente a los anticuerpos de captura. **V)** Las células mononucleares se retiran por inversión, se lava la placa con PBS y se adicionan los anticuerpos de detección (anti-IFN- γ conjugado a FITC y anti-IL-2 conjugado a biotina) **VI)** Se adicionan las enzimas *Horse radish peroxidase* (HRP-acoplada a un anticuerpo anti-FITC) y Estreptavidina-fosfatasa alcalina (EFA); la primera se une al anticuerpo de detección anti-IFN- γ por afinidad a FITC, mientras que la EFA se une al anticuerpo anti-IL-2 por afinidad entre la biotina y la avidina. **VII)** Se adiciona el sustrato para la HRP (AEC: 3-Amino-9-Etil-carbazol) y se deja desarrollar los precipitados de color rojo (15 minutos). **VIII)** Se lava la placa y se adiciona el sustrato para la EFA (BCIP/NBT: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolifosfato *p*-Toluidino y Cloruro de Nitro Azul Tetrazolio), dejando desarrollar los precipitados de color azul (5 minutos). **IX)** Se lava la placa y se deja secar durante toda la noche. Los precipitados de color rojo y azul (también llamados *spots*) se cuentan en un lector de ELISpot. **X)** Imagen representativa de un pozo con 250 000 células mononucleares de sangre periférica de un paciente con Tuberculosis pulmonar activa, estimuladas con PHA. Los precipitados o *spots* rojos corresponden a IFN- γ y los azules corresponden a IL-2.

JUSTIFICACIÓN

La TB continúa siendo un problema de salud a nivel mundial, y la incidencia de LTBI en México podría aumentar, ya que el control de esta enfermedad depende de varios factores, como la detección oportuna de la infección, el apego al tratamiento para evitar resistencia a los fármacos, y el control de otras enfermedades, como la diabetes mellitus y obesidad, que aumentan la susceptibilidad a desarrollar TB.

Actualmente ha incrementado el uso de la técnica ELISpot; sin embargo, esta técnica no detecta al 100 % de los casos positivos de TB, por lo que existe la necesidad de mejorar las técnicas de diagnóstico actuales, con el fin de detectar esta enfermedad de manera oportuna e iniciar el tratamiento contra la TB a la brevedad, de tal forma que se corte la cadena de transmisión.

Estudios han demostrado que la técnica de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 ha sido útil en el seguimiento de la evolución de los pacientes con infección por VIH. La metodología dual no se ha aplicado en el diagnóstico de la TB, por lo que nosotros evaluamos si la técnica de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 permite diferenciar a los pacientes con TB pulmonar activa de los voluntarios sanos.

HIPÓTESIS

En pacientes con tuberculosis pulmonar activa, en comparación con los voluntarios sanos, el número de células productoras de IFN- γ e IL-2 en respuesta a los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10 está incrementada significativamente.

I. Objetivo general

Determinar el número de células productoras de IFN- γ e IL-2 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB pulmonar activa.

II. Objetivos particulares

1. Elegir el inductor de estimulación máxima de las células mononucleares de sangre periférica para la producción de IFN- γ e IL-2, comparando a la Fitohemaglutinina (PHA) con el acetato de forbol-miristato + Ionomicina (PMA+I).
2. Estudiar la producción de IFN- γ e IL-2 en células mononucleares de sangre periférica, en respuesta a los antígenos micobacterianos ESAT-6, CFP-10 y PPD.
3. Comparar los resultados del número de células productoras de IFN- γ e IL-2 entre dos sistemas de ELISpot dual.
4. Bajo las condiciones estandarizadas previamente, comparar el número de células mononucleares provenientes de sangre periférica que producen IFN- γ e IL-2 en pacientes con TB activa y en voluntarios sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. Los participantes fueron informados detalladamente, y aceptaron participar en el estudio mediante la rúbrica en la carta de consentimiento informado.

I. Población de estudio

Entre el 2006 y 2007 se incluyeron 38 pacientes adultos con diagnóstico de TB pulmonar activa, de la región de Orizaba, Veracruz, los cuales acudieron al Sistema de Salud para recibir atención médica. El diagnóstico de TB pulmonar fue confirmado por baciloscopía y cultivo de esputo, y se excluyeron a todos los pacientes que presentaron co-morbilidades. Todos los pacientes fueron reclutados antes de recibir tratamiento contra la TB.

En el grupo de los voluntarios sanos se incluyeron a 16 adultos de la Ciudad de México, trabajadores del departamento de microbiología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), sin ninguna enfermedad, que tras aceptar su participación firmando el consentimiento informado, donaron una muestra de sangre para el estudio. Tanto a los pacientes como a los voluntarios sanos se les aplicó la prueba intradérmica de la tuberculina (PPD) y a los voluntarios sanos PPD+ se les realizó radiografía de tórax. Todas las muestras de sangre formaron parte de un banco de células que se mantuvo en congelación hasta su procesamiento.

II. Obtención de las muestras de sangre periférica

Se colectaron 20 ml de sangre periférica de los pacientes con TB activa y de los voluntarios sanos, utilizando heparina como anticoagulante. Los tubos se invirtieron cuidadosamente para homogenizar las muestras de sangre con la heparina y se mantuvieron a 4 °C durante su transporte y hasta el momento de su procesamiento.

III. Separación y congelación de células mononucleares de sangre periférica

Se realizó la separación de las células mononucleares de sangre periférica mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep como se describe a continuación. Se alcanzó la temperatura ambiente en las muestras de sangre y se realizó una dilución 1:2 en medio de cultivo, colocando 20 ml de medio RPMI 1640 (Lonza; Walkersville, Maryland) y 20 ml de la muestra de sangre heparinizada en un tubo de 50 ml (Falcon). Posteriormente se adicionaron 10 ml de Lymphoprep (Axis-Shield; Oslo; Densidad de 1.077 ± 0.001 g/ml) a través de una pipeta pasteur. Los tubos se centrifugaron durante 45 min a 1200 rpm, 25 °C, y se recuperó cuidadosamente la interface de células mononucleares por aspiración con una pipeta de transferencia de 3 ml; se adicionó medio de cultivo hasta 50 ml y se centrifugó a 1200 rpm, 15 min, 4 °C para lavar las células (realizando dos lavados). Se decantó completamente el sobrenadante utilizando una punta de micropipeta y enseguida se resuspendió el paquete celular en 1 ml de medio de cultivo completo (RPMI 1640 + 20 mM de L-Glutamina (Gibco; Paisley, Scotland) + 50 mg/ml de Sulfato de Gentamicina (Lonza; Walkersville, Maryland) + 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB; Hyclone Thermo Scientific; Salt Lake City, Utah) y se determinó la concentración de células obtenidas y su viabilidad mediante exclusión con azul tripano, colocando 10 μ l del colorante supravital más 10 μ l de la suspensión de células mononucleares, homogenizando perfectamente y colocando 10 μ l en la cámara de Neubauer para contar en el microscopio óptico. Finalmente, las células se congelaron, para lo cual se

centrifugaron a 1200 rpm durante 15 min, 4 °C y se eliminó el medio de cultivo completamente. El paquete celular se resuspendió en una mezcla de SFB descomplementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células se colocaron en un criotubo de 1.5 ml (manteniendo una cantidad de 5 a 8 millones de células/vial), y éstos se colocaron en un contenedor “Mr. Frosty” (Nalgene; USA), el cual se colocó en el ultracongelador a -70°C. Al siguiente día, los criotubos con las células congeladas se transfirieron a una caja de cartón que también se almacenó a -70°C, donde permanecieron hasta su procesamiento.

IV. Descongelación de células mononucleares de sangre periférica

Se preparó un baño de agua a 37 °C en el cual se introdujo un tubo falcon de 14 ml con 10 ml de medio de cultivo completo (RPMI 1640 + 20 mM de L-Glutamina + 50 mg/ml de sulfato de Gentamicina + 10 % de SFB). Una vez que el medio alcanzó los 37 °C aproximadamente, se introdujo el criotubo con las células en el baño de agua por unos minutos para descongelar las células y, cuando el hielo se descongeló, se tomó 1 ml de medio de cultivo completo a 37 °C y se le adicionó lentamente al criovial, se resuspendió el volumen cuidadosamente y se transfirieron las células en el tubo de 14 ml, deslizándolas por la pared lentamente. El tubo se homogenizó por inversión y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min a 25 °C. Posteriormente se decantó completamente el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo completo. Se determinó la concentración de las células y su viabilidad por exclusión con azul tripano. Para realizar la técnica de ELISpot dual, se preparó una suspensión celular a una concentración de 2.5×10^6 células/ml.

V. Determinación del número de células productoras de IFN- γ e IL-2 mediante la técnica de ELISpot dual

Se realizaron dos experimentos en paralelo para comparar el número de células mononucleares productoras de IFN- γ e IL-2 utilizando el sistemas de ELISpot dual de Abcam, Inc. (Science Park Cambridge), con respecto al sistema de ELISpot dual de R&D Systems Inc. (McKinley, Minneapolis). Posteriormente, utilizando la técnica de ELISpot dual de Abcam, se comparó el número de células productoras de IFN- γ e IL-2 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB pulmonar activa y de voluntarios sanos en respuesta a los antígenos micobacterianos ESAT-6, CFP-10 y PPD.

a) ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (sistema manufacturado por Abcam,Inc)

Para determinar el número de células productoras de IFN- γ e IL-2 se utilizó el sistema "*Interferon Gamma + IL-2 Human Elispot Kit*", siguiendo las instrucciones del fabricante descritas a continuación. Se adicionaron 25 μ l/pozo de etanol al 70% en condiciones de esterilidad para humedecer la membrana, durante 30 seg a temperatura ambiente (T.A). Luego se decantó el contenido de la placa y se lavó con PBS (Lonza; Walkersville, Maryland) para eliminar completamente el etanol. Se preparó la mezcla de anticuerpos de captura anti-IFN- γ y anti IL-2 y se colocaron 100 μ l/pozo, dejando incubar toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se decantó el contenido de los pozos y se lavó con 100 μ l/pozo de PBS. Para bloquear los sitios donde no hubo adhesión de los anticuerpos, se agregaron 100 μ l/pozo de la solución de PBS + 2% BSA y se incubó por 2 h a T.A. Se lavó la placa cuatro veces con 100 μ l/pozo de PBS y se agregaron 100 μ l/pozo de los estímulos a utilizar: Medio de cultivo completo, PHA (Sigma-Aldrich, St. Louis), ESAT-6 (Lionex GmbH; Braunschweig, Baja Sajonia), CFP-10 (Lionex GmbH; Braunschweig, Baja Sajonia), PPD (Statement Serum Institute; Pune, Maharashtra) o PMA+I (Sigma-Aldrich; St.

Louis, Missouri) y 100 μ l/pozo de la suspensión de las células mononucleares ajustadas a una concentración de 2.5×10^6 células/ml, para un volumen final de 200 μ l/pozo. Se cubrió la placa y se mantuvo a 37°C y 5% de CO₂ durante 20 h. Después del tiempo de incubación se eliminaron las células por inversión y se adicionaron 100 μ l/pozo de PBS + 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri), dejando incubar por 10 min a 4°C. Se lavó la placa tres veces con 100 μ l/pozo de PBS + 0.1% Tween-20 y se dispensaron 100 μ l/pozo de la mezcla de anticuerpos de detección anti-IFN- γ conjugado a FITC y anti-IL-2 conjugado a biotina, incubándola durante 1.5 h a T.A y luego se realizaron tres lavados con PBS + 0.1% Tween-20. Se preparó una mezcla de las enzimas HRP conjugada a un anticuerpo anti-FITC y AP conjugada a avidina, de la cual se agregaron 100 μ l/pozo, y se dejó incubando durante 1 h a T.A, para después retirar la base de plástico inferior y lavar la membrana con agua destilada. Para detectar a las células productoras de IFN- γ se adicionaron 100 μ l/pozo del sustrato AEC permitiendo que se llevara a cabo la reacción durante 15 min a T.A en oscuridad. Cuando se obtuvieron los precipitados o *spots* rojos, se decantó el contenido de los pozos y se lavó otra vez la membrana con agua destilada. Posteriormente, para detectar a las células productoras de IL-2 se adicionaron 100 μ l/pozo del sustrato BCIP/NBT permitiendo que la reacción se llevara a cabo por 10 min a T.A para permitir el desarrollo de los *spots* azules. Finalmente se lavaron ambas caras de la membrana con agua destilada, se secó la membrana y se contaron los *spot* en un lector de ELISpot (IMMUNOSPOT, Cellular Technology, Ltd, OHIO, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de *spots* (UFS) por cada 1×10^6 células. Se consideró un resultado positivo al valor de UFS tres veces mayor al valor de UFS desarrollados en ausencia de estímulo (medio):

$$\text{UFS en respuesta al estímulo}^{(+)} \geq 3[\text{UFS sin estímulo}] = \text{Resultado positivo para el estímulo}^{(+)}$$

b) ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (sistema manufacturado por R&D Systems Inc)

El sistema de R&D “*Human IFN-gamma/IL-2 Dual-Color ELISpot Kit*” ya viene sensibilizado con los anticuerpos de captura anti-IFN- γ y anti-IL-2. Para realizar esta técnica, se adicionaron 200 μ l/pozo de medio de cultivo completo (RPMI 1640 + 20 mM de L-Glutamina + 50 μ g/ml de sulfato de Gentamicina + 10% SFB) durante 20 min a T.A para pre-humedecer la membrana. Posteriormente se decantó el contenido de los pozos y se adicionaron 100 μ l/pozo de los estímulos a utilizar (Medio de cultivo, PHA, ESAT-6, CFP-10, PPD, PMA+I) y 100 μ l/pozo de la suspensión de las células ajustadas a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. Se cubrió la placa y se incubó por 20 h a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente se decantaron las células, se lavó la placa cuatro veces con 200 μ l/pozo de la solución de lavado, y se colocaron 100 μ l/pozo de la mezcla de anticuerpos de detección anti-IFN- γ biotinilado y anti-IL-2 conjugado a la enzima HRP, dejando incubar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se decantó el contenido de la placa y se adicionó la enzima EFA, la cual se une por afinidad al anticuerpo anti-IFN- γ biotinilado. Después de cuatro lavados se adicionaron 100 μ l/pozo de la primera solución de sustrato BCIP/NTB para detectar al IFN- γ . Luego de 1 h de incubación a T.A se lavó la placa con agua destilada y se adicionaron 100 μ l/pozo de la segunda solución de sustrato AEC para detectar a la IL-2, dejando desarrollar el color por 20 min a T.A. Finalmente se lavó la placa con agua destilada y se dejó secar protegida de la luz. Cuando estuvo completamente seca, se contaron los *spots* en un lector de ELISpot (IMMUNOSPOT, Cellular Technology, Ltd, OHIO, U.S.A). Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de *spots* (UFS) por cada 1×10^6 células. Se consideró un resultado positivo al valor de UFS tres veces mayor al valor de UFS desarrollados en ausencia de estímulo (medio):

UFS en respuesta al estímulo⁽⁺⁾ \geq 3[UFS sin estímulo] = Resultado positivo para el estímulo⁽⁺⁾

VI. Control de calidad de los resultados de ELISpot dual.

Antes de comparar los resultados del número de células productoras de IFN- γ e IL-2 de pacientes con TB pulmonar con respecto a los voluntarios sanos, se realizó el control de calidad de los resultados reportados por el lector de ELISpot, utilizando el mismo lector (IMMUNOSPOT, Cellular Technology, Ltd, OHIO, U.S.A). Este análisis consiste en observar cuidadosamente las imágenes de cada pozo para verificar que el número de UFS que el equipo reporte corresponda verdaderamente a *spots*, y no a algún artefacto o fondo de color en la placa que pudiera haber sido detectado como *spot*, sin serlo. Si se observa que el lector contó un falso *spot*, éste se delimita, y en automático, el equipo lo elimina de la cuenta total de UFS. Posteriormente se obtuvo la cuenta de células mononucleares productoras de IFN- γ e IL-2, y se comparó la respuesta de los pacientes con TB pulmonar activa, con respecto a los voluntarios sanos.

VII. Análisis estadístico.

Se utilizó el programa de GraphPad Prism 6.02 para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, siguiendo la prueba de Wilcoxon para comparar el efecto de PHA con respecto a PMA+I en la máxima estimulación de las células mononucleares para la producción de IFN- γ e IL-2. La prueba de Wilcoxon también se utilizó para comparar los resultados de los dos sistemas de ELISpot dual: Abcam y R&D. Esta prueba es para comparar los diferentes tratamientos entre el mismo grupo.

Se realizó la prueba de Mann-Whitney para comparar la respuesta entre los pacientes y los voluntarios sanos en respuesta a los antígenos micobacterianos ESAT-6, CFP-10 y PPD. El número de células productoras de IFN- γ e IL-2 en respuesta a los estímulos PHA, ESAT-6, CFP-10, PPD, y PMA+I se reportó como la

mediana de las UFS, con el rango de datos. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

1.- Datos demográficos y características de los pacientes con TB y de los voluntarios sanos.

En este estudio se incluyeron 38 pacientes con diagnóstico confirmado de TB pulmonar activa mediante cultivo y baciloscopía a quienes se les tomó una muestra de sangre antes de iniciar el tratamiento. El 68.4% correspondieron a hombres y 31.6% a mujeres, con un rango de edad de 18 a 74 años, y se les realizó la prueba intradérmica de la tuberculina, identificando a 36 pacientes PPD positivo y 2 PPD negativo. Para el grupo de los voluntarios sanos se incluyeron 68.7% de hombres y 31.3% de mujeres, con un intervalo de edad entre 18 y 47 años. De los 16 voluntarios, 8 fueron positivos para PPD y 8 fueron negativos. Todos los voluntarios sanos PPD+ tuvieron una radiografía de tórax normal (Tabla 1).

TABLA 1. Características de los grupos de estudio

	PACIENTES CON TB n = 38	VOLUNTARIOS SANOS n = 16
EDAD (Rango)	18-74 años	18-47 años
SEXO (H/M) (%H/%M)	26 / 12 (68.4% / 31.6%)	11 / 5 (68.7% / 31.3%)
PPD (+/-)	36 / 2	8 / 8

TB: Tuberculosis; **H:** Hombres; **M:** Mujeres; **PPD:** Derivado Proteico Purificado

2.- PMA+I induce un mayor número de células productoras de IFN- γ e IL-2 en comparación con PHA en ambos sistemas de ELISpot dual.

Para elegir el inductor que produjera la máxima estimulación para la producción de IFN- γ e IL-2 en las células mononucleares obtenidas a partir de sangre periférica, se comparó la PHA con respecto a PMA+I en células pacientes con TB pulmonar activa. PMA+I indujo mayor número de células productoras de IFN- γ , en comparación con PHA en ambos sistemas de ELISpot dual (Abcam y R&D; $p=0.0078$). De acuerdo al criterio de positividad (ver materiales y métodos), observamos que en el sistema de R&D, tanto PMA+I como PHA indujeron la producción de IFN- γ en 8/8 (100%) individuos, a diferencia de los resultados con el sistema de Abcam, donde PMA+I indujo la producción de IFN- γ en 8 /8 (100%) y PHA sólo en 7/8 (87.5%) individuos. (Figura 7a).

La mediana del número de células productoras de IFN- γ en respuesta a PMA+I fue de 4,145 (1,762 – 5,108) UFS para el sistema de Abcam, y de 4,993 (2,832 - 8,558) UFS para el sistema de R&D, y todos los individuos dieron una respuesta positiva. Con base en estos resultados, PMA+I es un inductor más potente que PHA para la producción de IFN- γ , pues con PHA tan sólo se observó una mediana del número de células productoras de IFN- γ de 111 (20 - 330) UFS utilizando el sistema de Abcam, y 164 (120 - 750) UFS en el sistema R&D (Tabla 2).

En cuanto a la producción de IL-2, también los resultados mostraron que PMA+I indujo mayor número de células productoras de esta interleucina en comparación con PHA, utilizando el sistema R&D ($p<0.05$), sin embargo, con el sistema Abcam no observamos diferencia significativa entre los dos inductores. En ambos sistemas de ELISpot dual, PMA+I estimuló la producción de IL-2 en 8/8 (100%), mientras que PHA indujo la liberación de IL-2 en 8/8 (100%) individuos utilizando el sistema Abcam, y en 7/8 (87.5%) utilizando R&D (Figura 7b).

La mediana del número de células productoras de IL-2 en respuesta a PMA+I fue de 733 (160 – 1,110) UFS con el sistema Abcam, y de 2,077 (1,866 – 2,288) UFS

utilizando R&D, mientras que en respuesta a PHA se contaron 1,215 (136 – 2,138) UFS utilizando el sistema Abcam y de 136 (12 - 378) UFS con el sistema R&D (Tabla 2).

Al comparar los dos sistemas de ELISpot dual observamos que el de R&D presentó un alto fondo de color azul en la membrana, aspecto por el cual, se dificultó la visualización y conteo de los *spots* en algunas muestras de los pacientes, a diferencia del sistema Abcam.

Con base en los resultados y observaciones, elegimos utilizar PMA+I como control positivo porque fue el inductor que provocó la máxima estimulación celular para la producción de IFN- γ e IL-2.

TABLA 2. Comparación entre PHA y PMA+I para obtener la máxima activación celular

Sistema de ELISpot dual	IFN- γ		IL-2	
	PHA	PMA+I	PHA	PMA+I
Abcam Mediana UFS (Intervalo)	111 (20 - 330)	4,145 (1,762 – 5,108)	1,215 (136 – 2,138)	733 (160 – 1,110)
R&D Mediana UFS (Intervalo)	164 (120 – 750)	4,993 (2,832 – 8,558)	136 (12 – 378)	2,077 (1,866 – 2,288)

PHA: Fitohemaglutinina; **PMA+I:** acetato de Forbol-miristato más Ionomicina; **UFS:** Unidades Formadoras de *Spots*

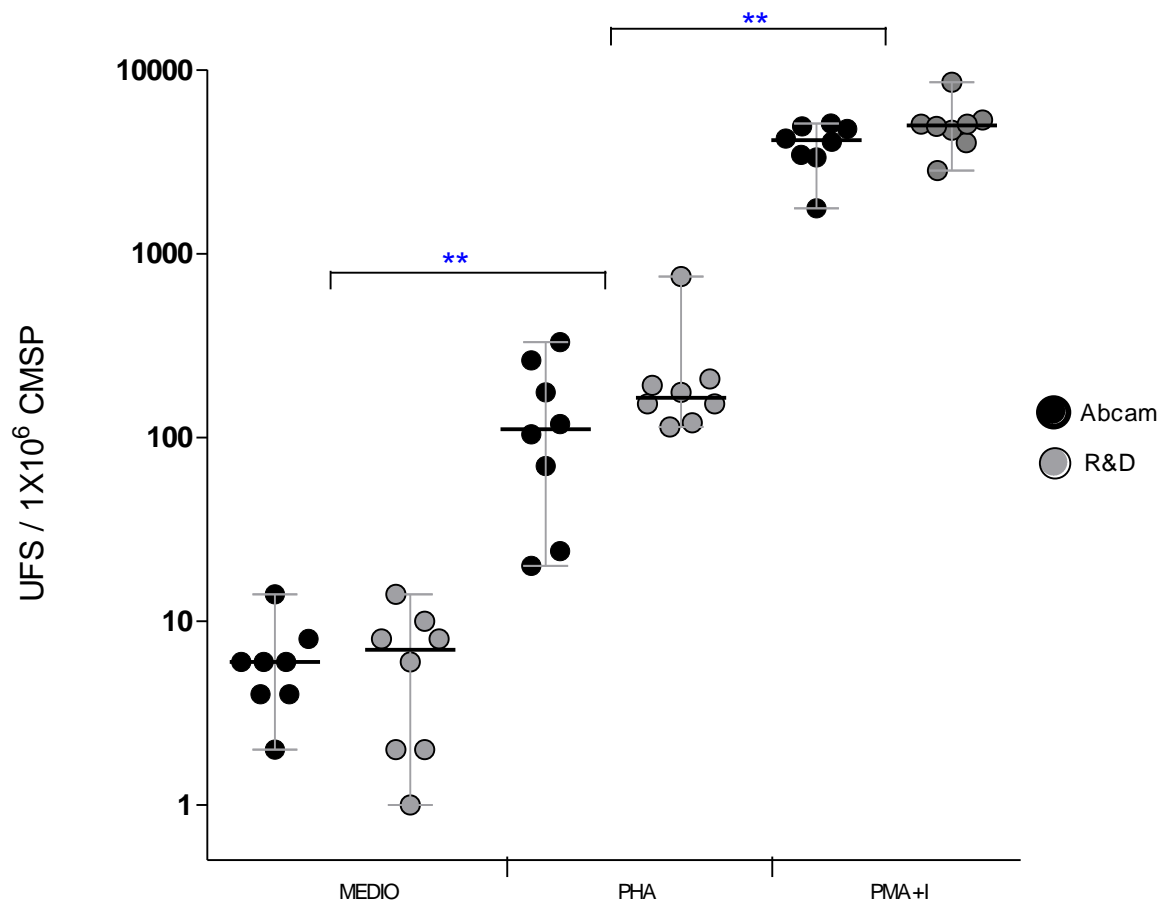


Figura 7a. Determinación del número de células productoras de IFN- γ en respuesta a PHA o PMA+I. Se colocaron 250 000 células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB en presencia de PHA (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml) o PMA+I (100 μ l/pozo de una mezcla de PMA a 1 ng/ml e Isonomicina a 500 ng/ml), y medio de cultivo suplementado con 10 % SFB como control de estimulación basal, utilizando dos sistemas de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (Abcam y R&D). Las células se incubaron en presencia de los estímulos multipotenciales durante 20 h a 37°C, 5% de CO₂ y posteriormente se continuó con el revelado de las placas de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Los resultados se reportaron como UFS / 1x10⁶ células (UFS; Unidades formadoras de Spots) y se realizó una prueba estadística pareada de Wilcoxon para determinar si había diferencia entre ambos estímulos inespecíficos.

CMSP = células mononucleares de sangre periférica;

n = 8 pacientes TB pulmonar activa;

** p=0.0078

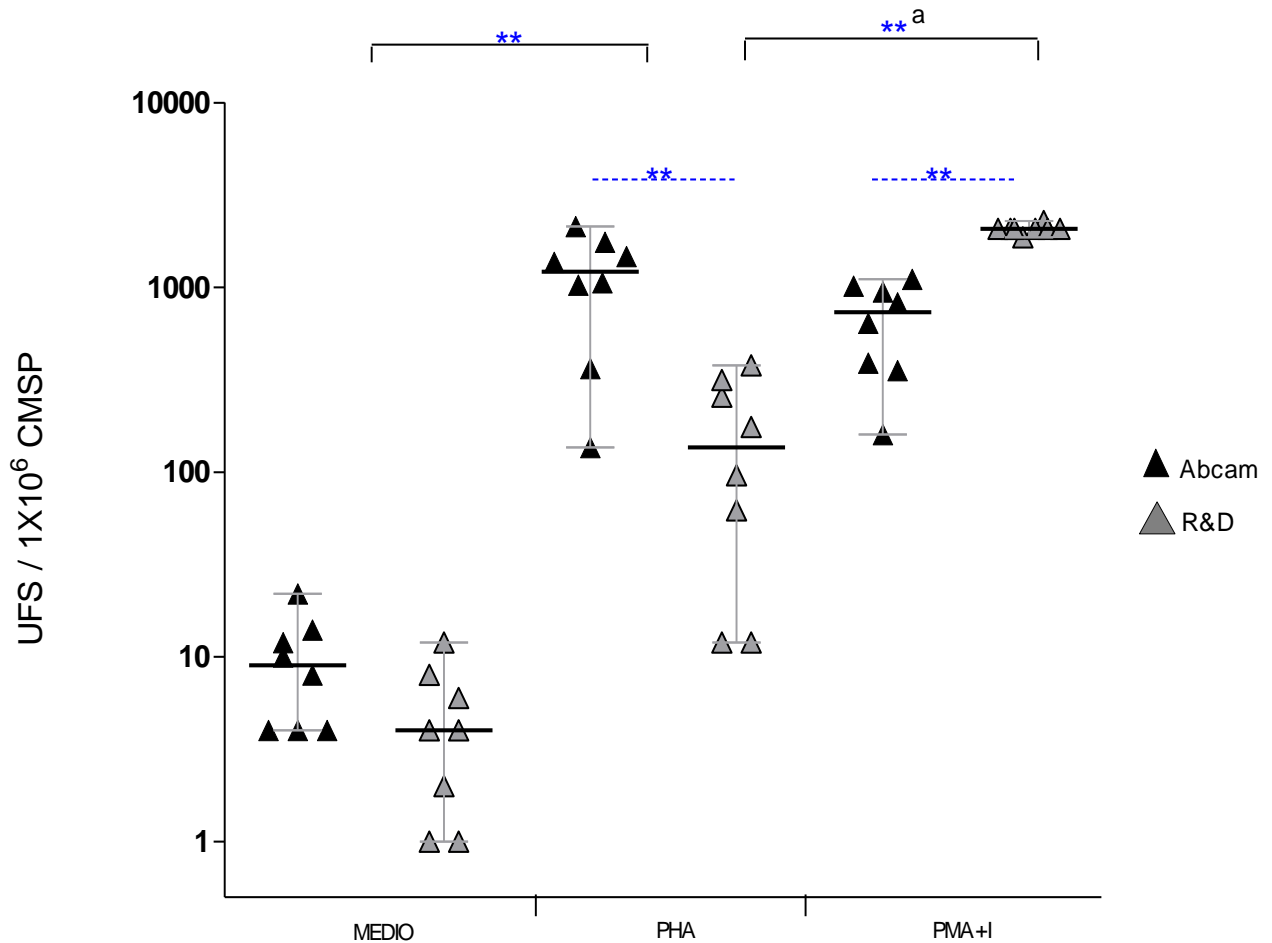


Figura 7b. Determinación del número de células productoras de IL-2 en respuesta a PHA o PMA+I. Se colocaron 250 000 células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB en presencia de PHA (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml) o PMA+I (100 μ l/pozo de una mezcla de PMA a 1 ng/ml e Ionomicina a 500 ng/ml), y medio de cultivo suplementado con 10 % SFB como control de estimulación basal, utilizando dos sistemas de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (Abcam y R&D). Las células se incubaron en presencia de los estímulos multipotenciales durante 20 h a 37°C, 5% de CO₂ y posteriormente se continuó con el revelado de las placas de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Los resultados se reportaron como UFS / 1x10⁶ células (UFS; *Unidades Formadoras de Spots*) y se realizó una prueba estadística pareada de Wilcoxon para determinar si había diferencia entre ambos estímulos inespecíficos.

CMSP = células mononucleares de sangre periférica;

n = 8 pacientes TB pulmonar activa; ** p=0.0078;

**a P<0.05 entre PHA y PMA+I determinadas en el sistema R&D

3.- El sistema de ELISpot dual Abcam detecta a las células productoras de IFN- γ y de IL-2 en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD.

Después de seleccionar el estímulo empleado como control de máxima estimulación celular para la producción de IFN- γ e IL-2, comparamos la utilidad de dos sistemas de ELISpot dual (Abcam y R&D) en la detección de la respuesta de las células mononucleares de 8 pacientes con TB pulmonar activa, a los antígenos micobacterianos ESAT-6, CFP-10 y PPD. El sistema de R&D detectó más células productoras de IFN- γ en respuesta a CFP-10 y PPD, en comparación con Abcam ($p=0.0078$). Tanto R&D como Abcam detectaron valores parecidos de células productoras de IFN- γ en respuesta a ESAT-6 (Figura 8a).

Con el sistema Abcam se obtuvo una mediana del número de células productoras de IFN- γ de 4 (0 - 26), 21 (0 - 56) y 12 (0 - 100) UFS en respuesta a ESAT-6, CFP-10 y PPD, respectivamente (Tabla 3), y el número de individuos positivos para IFN- γ , de acuerdo al criterio de positividad (valor superior a 3 veces el medio), fue de 2/8 (25%) para ESAT-6, 5/8 (62.5%) para CFP-10 y 4/8 (50%) para PPD. En contraste, utilizando el sistema R&D la mediana del número de células productoras de IFN- γ fue de 34 (2 - 88), 125 (44 - 266) y 231 (32 - 410) UFS en respuesta a ESAT-6, CFP-10 y PPD, respectivamente (Tabla 3), de tal forma que 5/8 (62.5%) individuos fueron positivos para IFN- γ en respuesta a ESAT-6, y 8/8 (100%) fueron positivos a CFP-10 y a PPD (Figura 8c).

En cuanto a la producción de IL-2, utilizando el sistema Abcam se detectó un mayor número de células productoras de esta interleucina en respuesta a ESAT-6 y CFP-10 en comparación con el sistema R&D ($p=0.0078$). No se observó diferencia estadísticamente significativa en la detección de células productoras de IL-2 en respuesta a PPD comparando ambos sistemas (Figura 8b). La mediana del número de células productoras de IL-2 en respuesta a ESAT-6, CFP-10 y PPD fue de 712 (0 - 2,984), 140 (0 - 1,622) y 22 (0 - 246) UFS respectivamente, detectados por el sistema Abcam, y de 2 (0 - 22), 10 (0 - 86) y 19 (0 - 68) UFS detectados por el sistema

R&D (Tabla 3). Con el sistema de Abcam y de acuerdo al criterio de positividad, 6/8 (75%) de los individuos fueron positivos para IL-2 en respuesta a ESAT-6, 7/8 (87.5%) a CFP-10 y 5/8 (62.5%) a PPD, mientras que con el sistema R&D, 2/8 (25%) resultaron positivos para IL-2 en respuesta a ESAT-6 y 5/8 (62.5%) a CFP-10 y PPD (Figura 8c).

Considerando estos resultados, se eligió el sistema de Abcam para comparar la respuesta de los pacientes con TB pulmonar respecto a los voluntarios sanos, en respuesta a antígenos de *M.tuberculosis*, porque fue el sistema de ELISpot dual que nos permitió detectar a ambas citocinas (IFN- γ e IL-2) al mismo tiempo, en comparación con R&D, el cual presentó un fondo intenso en la membrana de las placas dificultando la detección de la IL-2 producida en respuesta a los antígenos micobacterianos.

TABLA 3: Comparación de dos sistemas de ELISpot dual para evaluar el número de células productoras de IFN- γ e IL-2, en respuesta a antígenos micobacterianos

Sistema de ELISpot dual	IFN- γ			IL-2		
	ESAT-6	CFP-10	PPD	ESAT-6	CFP-10	PPD
Abcam Mediana UFS (Intervalo)	4 (0 – 26)	21 (0 – 56)	12 (0 – 100)	712 (0 – 2,984)	140 (0 – 1,622)	22 (0 – 246)
R&D Mediana UFS (Intervalo)	34 (2 – 88)	125 (44 – 266)	231 (32 – 410)	2 (0 – 22)	10 (0 – 86)	19 (0 – 68)

UFS: Unidades Formadoras de Spots; **ESAT-6:** Early Secretory Antigen Target 6 KDa; **CFP-10:** Culture Filtrated Purified 10 KDa; **PPD:** Purified Protein Derivated.

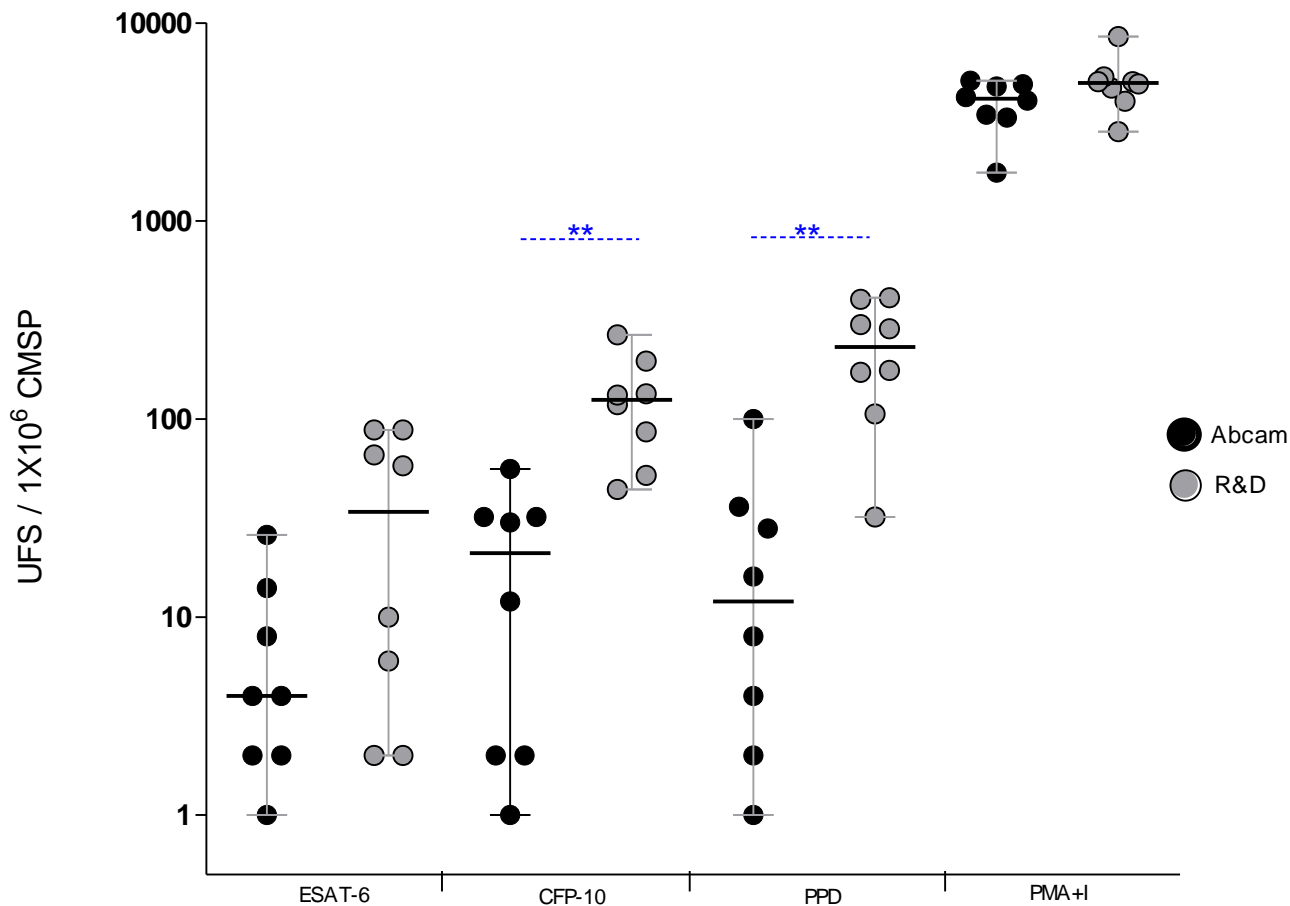


Figura 8a. Determinación del número de células productoras de IFN- γ en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD. Se colocaron 250 000 células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB en presencia de los antígenos ESAT-6 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), CFP-10 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml) o PPD (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), utilizando PMA+I como control positivo y medio de cultivo suplementado con 10 % SFB como control de estimulación basal, por 20 h a 37°C, 5% CO₂. Para analizar los resultados se realizó el conteo de células secretoras de IFN- γ en presencia de cada uno de los antígenos y a este valor se le restó el número de células que produjeron la citocina sin ser estimuladas. Los resultados se expresaron como UFS / 1x10⁶ células (UFS; *Unidades Formadoras de Spots*) y se realizó una prueba estadística pareada de *Wilcoxon* para evaluar si hubo diferencia significativa entre los dos sistemas de ELISpot dual: Abcam y R&D Systems (líneas punteadas azules).

CMSP = células mononucleares de sangre periférica;

n = 8 pacientes con TB;

** p=0.0078

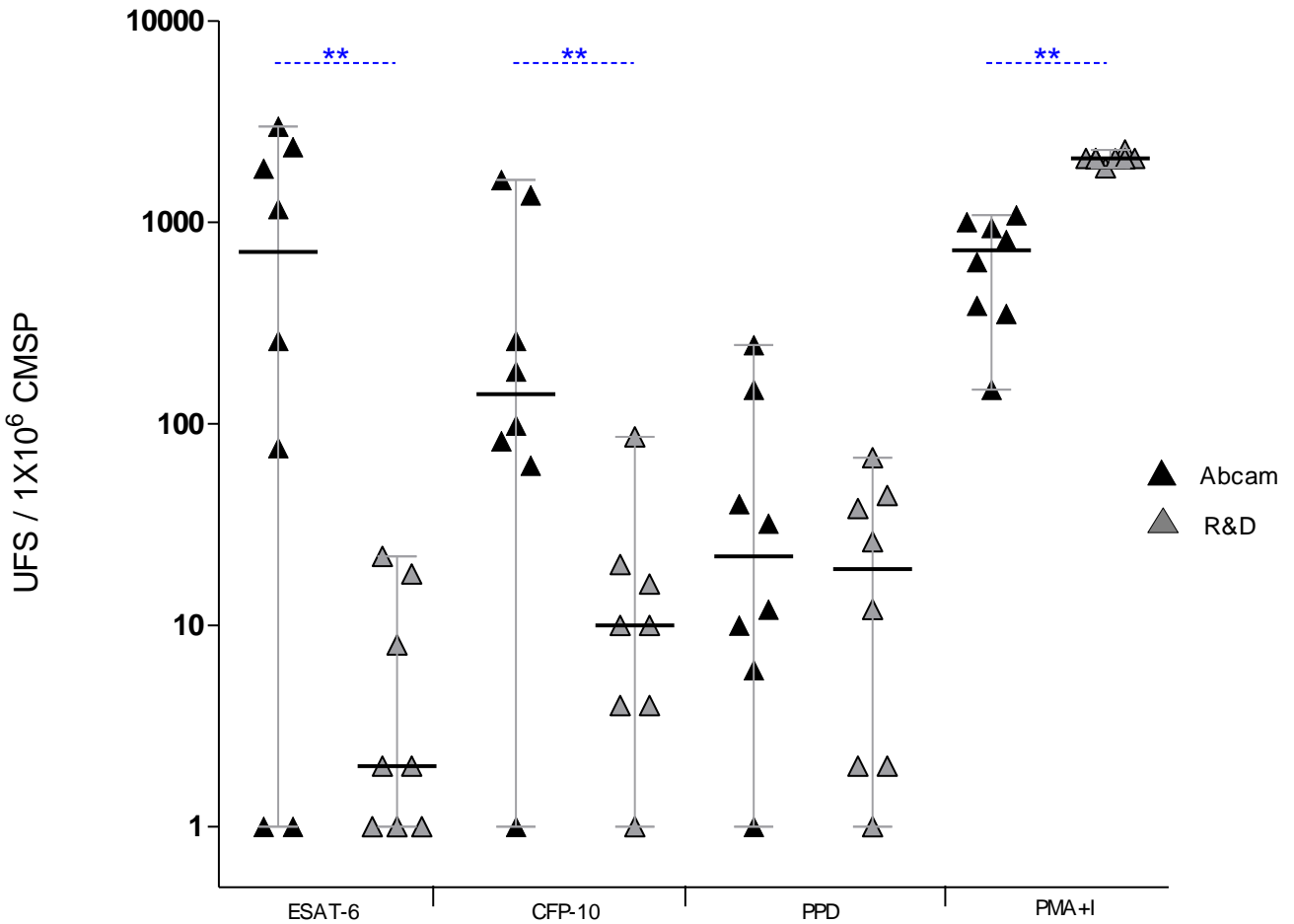


Figura 8b. Determinación del número de células productoras de IL-2 en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD.

Se colocaron 250 000 células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB en presencia de los antígenos ESAT-6 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), CFP-10 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml) o PPD (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), utilizando PMA+I como control positivo y medio de cultivo suplementado con 10 % SFB como control de estimulación basal, por 20 h a 37°C, 5% CO₂. Para analizar los resultados se realizó el conteo de células secretoras de IL-2 en presencia de cada uno de los antígenos y a este valor se le restó el número de células que produjeron la interleucina sin ser estimuladas. Los resultados se expresaron como UFS / 1x10⁶ células (UFS; *Unidades Formadoras de Spots*) y se realizó una prueba estadística pareada de *Wilcoxon* para evaluar si hubo diferencia significativa entre los dos sistemas de ELISpot dual: Abcam y R&D Systems (líneas punteadas azules).

CMSP = células mononucleares de sangre periférica;

n = 8 pacientes con TB;

** p=0.0078

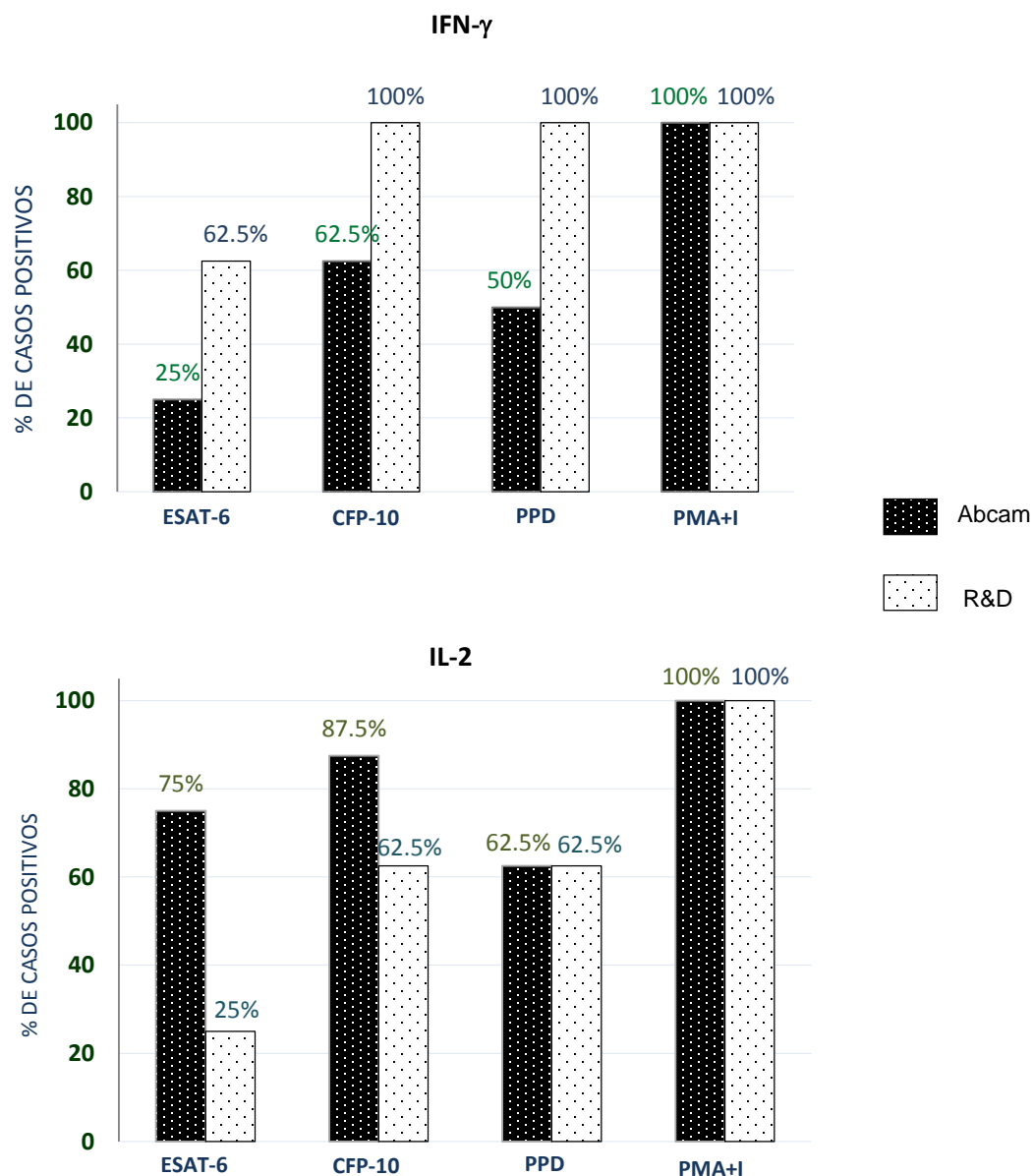


Figura 8c. Porcentaje de casos positivos para IFN- γ o para IL-2 en respuesta a ESAT-6, CFP-10 y PPD. Se colocaron 250 000 células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB en presencia de los antígenos micobacterianos ESAT-6 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), CFP-10 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), y PPD (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), utilizando dos sistemas de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 (Abcam y R&D). Se utilizó como control positivo PMA+I (100 μ l/pozo de una mezcla de PMA a 1 ng/ml e Isonomicina a 500 ng/ml) y medio de cultivo suplementado con 10% SFB como control de estimulación basal. Las células de 8 pacientes con TB se estimularon durante 20 h a 37°C, 5% CO₂ y posteriormente se continuó con el revelado de las placas de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Los resultados se reportaron como el porcentaje de casos positivos para IFN- γ (arriba) o para IL-2 (abajo) considerando el criterio de positividad establecido, donde un valor es positivo si rebasa tres veces el número de células productoras sin haber sido estimuladas.
n = 8 pacientes TB

4.- La detección del número de células productoras de IL-2 podría ser un biomarcador útil para el diagnóstico de TB activa.

Una vez que elegimos el sistema de Abcam, procedimos a determinar el número de células productoras de IFN- γ e IL-2 en pacientes con TB pulmonar con respecto a voluntarios sanos, PPD + y PPD -. Los pacientes con TB presentaron un mayor número de células productoras de IFN- γ con respecto a los voluntarios sanos, tanto en condiciones basales (medio) ($p=0.005$) como en respuesta a ESAT-6 ($p=0.029$), pero en respuesta a CFP-10, PPD y PMA+I no hubo diferencia significativa entre ambos grupos de estudio (Figura 9a). En el grupo de los sujetos sanos, la mediana del número de células productoras de IFN- γ en condiciones basales, y en respuesta a ESAT-6, CFP-10, PPD y PMA+I fue de 2 (0 - 6), 4 (0 - 14), 4 (0 - 114), 8 (0 - 50) y 3,008 (736 - 4,618) UFS, respectivamente, mientras que en el grupo de los pacientes la mediana de la respuesta a éstos mismos antígenos fue de 4 (0 - 18), 6 (0 - 374), 13 (0 - 88), 13 (0 - 102) y 2,422 (106 - 5,108) UFS (Tabla 4).

Por otro lado, el número de células productoras de IL-2 en los pacientes fue mayor que en los voluntarios sanos al estimular las células con ESAT-6 ($p=0.0002$), CFP-10, PPD y PMA+I ($p<0.0001$) (Figura 9b). En los voluntarios sanos, la mediana del número de células productoras de IL-2 en respuesta a ESAT-6, CFP-10, PPD, PMA+I y medio de cultivo sin estímulo fue de 4 (0 - 8), 4 (0 - 28), 4 (0 - 10), 192 (60 - 448) y 6 (2 - 14) UFS respectivamente. En el grupo de los pacientes, la mediana del número de células productoras de IL-2 fue de 8 (0 - 2,988), 16 (4 - 1,626), 19 (4 - 538), 457 (116 - 2,376) y 6 (0 - 22) UFS en respuesta a los mismos antígenos (Tabla 5). En este grupo de estudio se observaron dos poblaciones, una que produce más de 50 UFS de IL-2 y otra que produce menos, por lo que se realizó un análisis para estudiar la respuesta de cada paciente a ESAT-6 en comparación con la respuesta a CFP-10 y PPD, y los resultados mostraron que, aquellos individuos que responden a ESAT-6 produciendo menos de 50 spots de IL-2, también producen menos de 50 spots en respuesta a CFP-10 y PPD. Probablemente estas diferencias en la respuesta se deben a la variabilidad genética entre los individuos (Figura 9c).

De esta forma, en el grupo de los pacientes con TB, el porcentaje de individuos positivos para IFN- γ en respuesta a ESAT-6 fue de 34.2% y para CFP-10 de 55.3%, mientras que en el grupo de los sujetos sanos, el porcentaje de individuos positivos para ESAT-6 fue de 18.8% y para CFP-10 de 43.8%. El porcentaje de individuos positivos en respuesta a PPD fue mayor en el grupo de los voluntarios sanos (56.3%) en comparación con el grupo de los pacientes (50.0%) (Figura 10a).

En contraste, ninguno de los sujetos sanos cumplió con el criterio de positividad para la producción de IL-2 en respuesta a ESAT-6 y PPD, mientras que el 31.6% de los pacientes con TB fueron positivos en respuesta a ESAT-6, y 44.7% a PPD. El porcentaje de respuesta hacia CFP-10 fue mayor en el grupo de los pacientes en comparación con el grupo de los voluntarios sanos (50.0% y 18.8% respectivamente) (Figura 10b).

TABLA 4. Número de células productoras de IFN- γ de pacientes con TB pulmonar activa y de voluntarios sanos en respuesta a antígenos micobacterianos

Grupos de estudio	IFN- γ				
	MEDIO	ESAT-6	CFP-10	PPD	PMA+I
Pacientes TB activa Mediana UFS (Intervalo)	4 (0 – 18)	6 (0 – 374)	13 (0 – 88)	13 (0 – 102)	2,422 (106 – 5,108)
Voluntarios sanos Mediana UFS (Intervalo)	2 (0 – 6)	4 (0 – 14)	4 (0 – 114)	8 (0 – 50)	3,008 (736 – 4,618)

UFS: Unidades Formadoras *de Spots*; **ESAT-6:** Early Secretory Antigen Target 6 KDa; **CFP-10:** Culture Filtrated Purified 10 KDa; **PPD:** Purified Protein Derivated; **PMA+I:** acetato de Forbol-miristato más Ionomicina.

TABLA 5. Número de células productoras de IL-2 de pacientes con TB pulmonar activa y de voluntarios sanos en respuesta a antígenos micobacterianos

Grupos de estudio	IL-2				
	MEDIO	ESAT-6	CFP-10	PPD	PMA+I
Pacientes TB activa Mediana UFS (Intervalo)	6 (0 – 22)	8 (0 – 2,988)	16 (4 – 1,626)	19 (4 – 538)	457 (116 – 2,376)
Voluntarios sanos Mediana UFS (Intervalo)	6 (2 – 14)	4 (0 – 8)	4 (0 – 28)	4 (0 – 10)	192 (60 – 448)

UFS: Unidades Formadoras *de Spots*; **ESAT-6:** Early Secretory Antigen Target 6 KDa; **CFP-10:** Culture Filtrated Purified 10 KDa; **PPD:** Purified Protein Derivated; **PMA+I:** acetato de Forbol-miristato más Ionomicina.

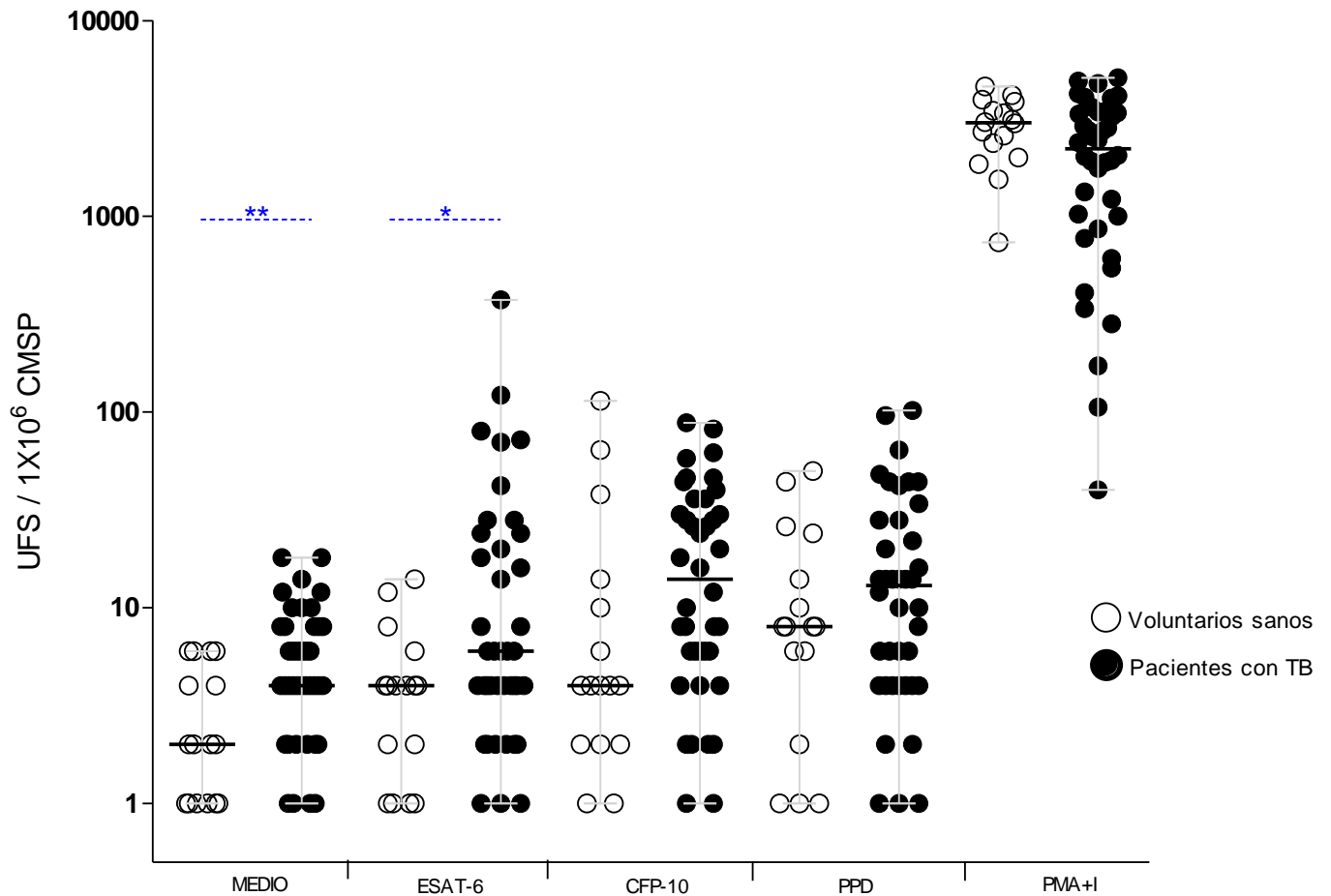


Figura 9a. Determinación del número de células productoras de IFN- γ en pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos. Se colocaron las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB y de voluntarios sanos en presencia de los antígenos ESAT-6 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), CFP-10 (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml) o PPD (100 μ l/pozo de una solución stock a 10 μ g/ml), utilizando PMA+I como control positivo o medio de cultivo suplementado con 10% SFB como control negativo. Las células se incubaron en presencia de los estímulos durante 20 h a 37°C, 5% CO₂, en placas de 96 pozos de ELISpot dual (sistema de Abcam). Se siguieron las instrucciones del fabricante para revelar los spots, mismos que se contaron en el lector de ELISpot. Los resultados se presentaron como UFS / 1 x 10⁶ células (UFS; *Unidades Formadoras de Spots*). Se realizó una prueba estadística no pareada de *Mann-Whitney* para evaluar la diferencia entre los dos grupos de estudio (líneas punteadas).

CMSP = células mononucleares de sangre periférica; n = 38 pacientes TB vs 16 voluntarios sanos *p=0.029; **p=0.005

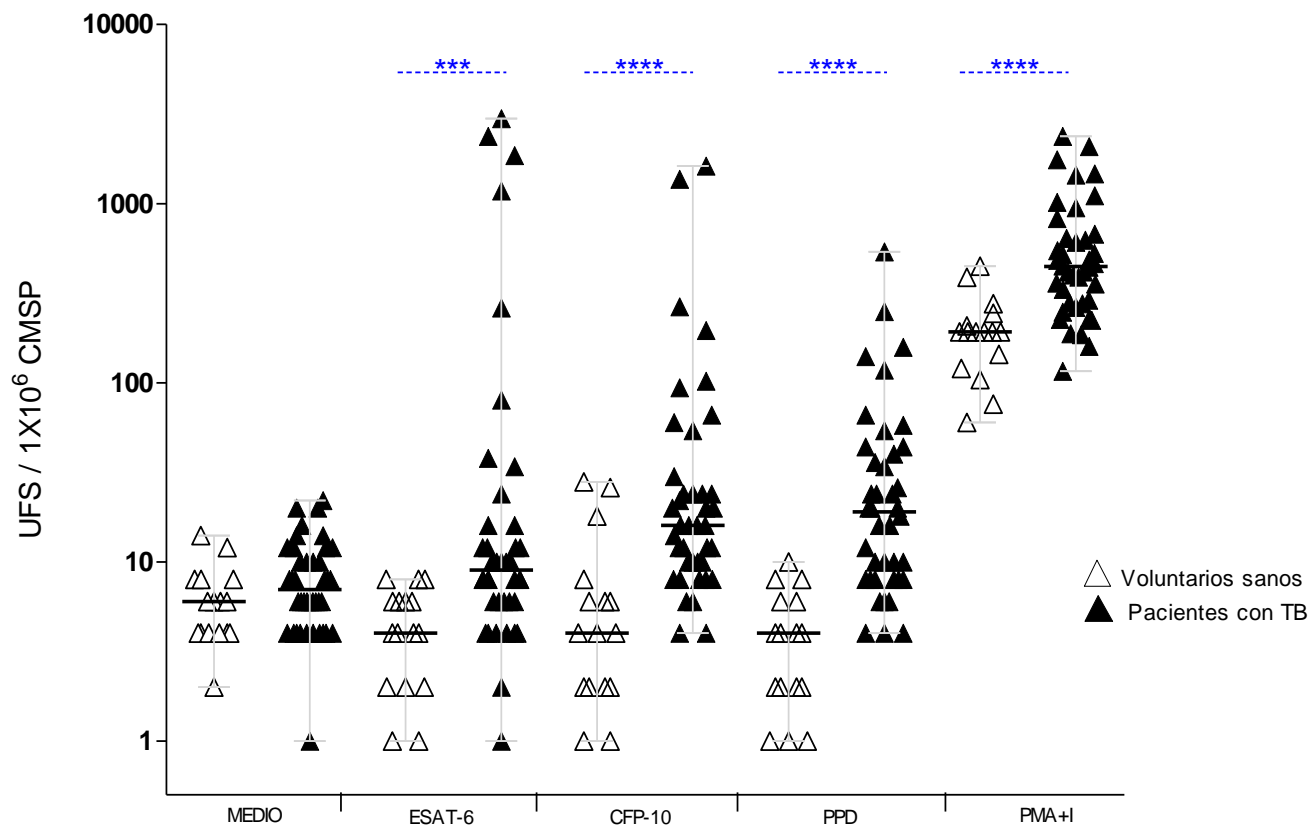


Figura 9b. Determinación del número de células productoras de IL-2 en pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos. Se colocaron las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB y de voluntarios sanos en presencia de los antígenos ESAT-6 (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml), CFP-10 (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml) o PPD (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml), utilizando PMA+I como control positivo o medio de cultivo suplementado con 10% SFB como control negativo. Las células se incubaron en presencia de los estímulos durante 20 h a 37°C, 5% CO₂, en placas de 96 pozos de ELISpot dual (sistema de Abcam). Se siguieron las instrucciones del fabricante para revelar los spots, mismos que se contaron en el lector de ELISpot. Los resultados se presentaron como UFS / 1 x 10⁶ células (UFS; *Unidades Formadoras de Spots*). Se realizó una prueba estadística no pareada de *Mann-Whitney* para evaluar la diferencia entre los dos grupos de estudio (líneas punteadas).

CMSP = células mononucleares de sangre periférica; n = 38 pacientes TB vs 16 voluntarios sanos

***p=0.0002;

****p<0.0001

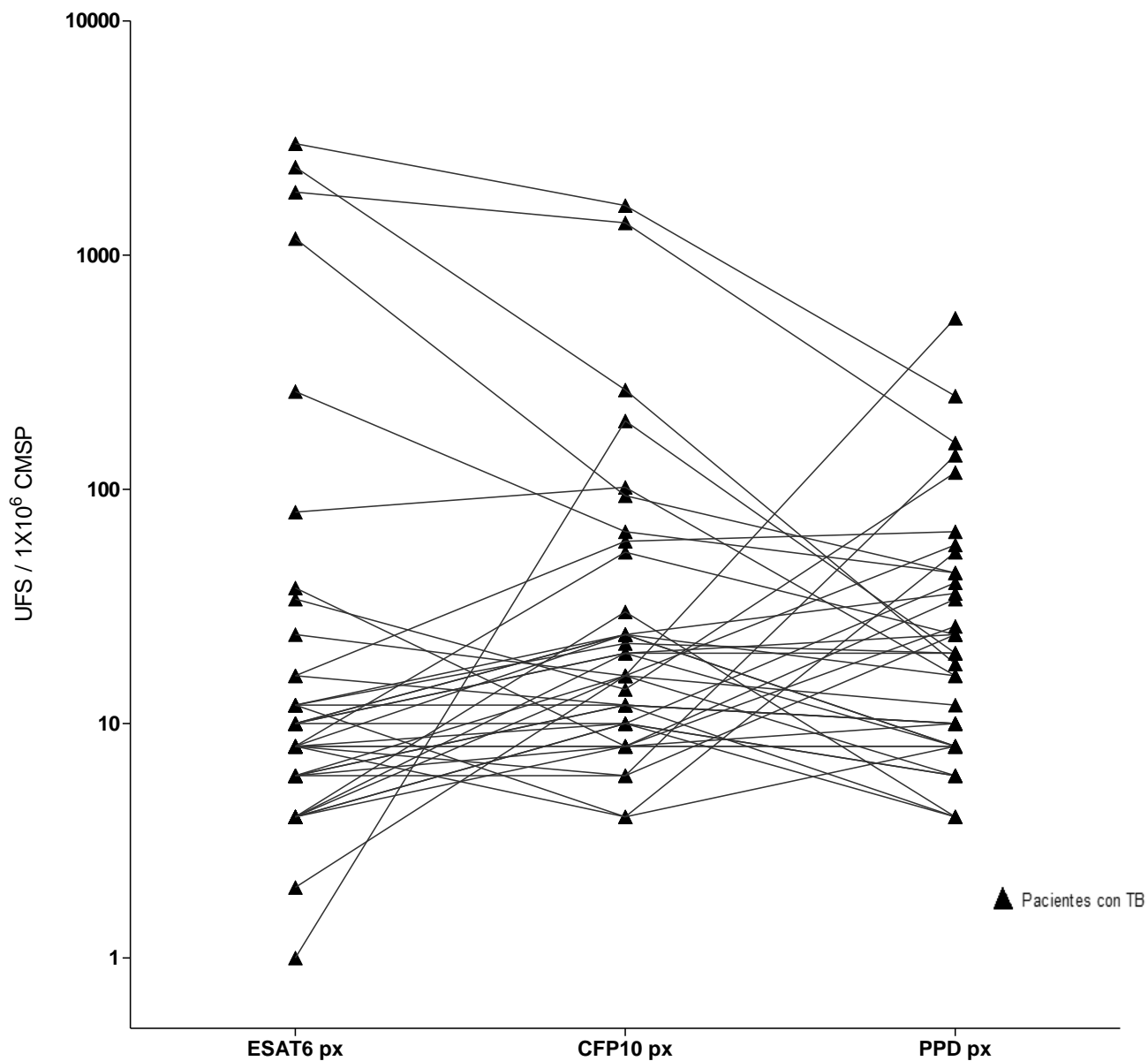


Figura 9c. Determinación del número de células productoras de IL-2 en respuesta a los antígenos ESAT-6, CFP-10 y PPD en pacientes con TB pulmonar activa. Se muestra la relación que existe entre la respuesta generada hacia ESAT-6, CFP-10 y PPD. En general, los individuos que producen menos de 50 UFS por millón de células en respuesta a ESAT-6 son los mismos que producen menos de 50 UFS en respuesta a CFP-10 y PPD.

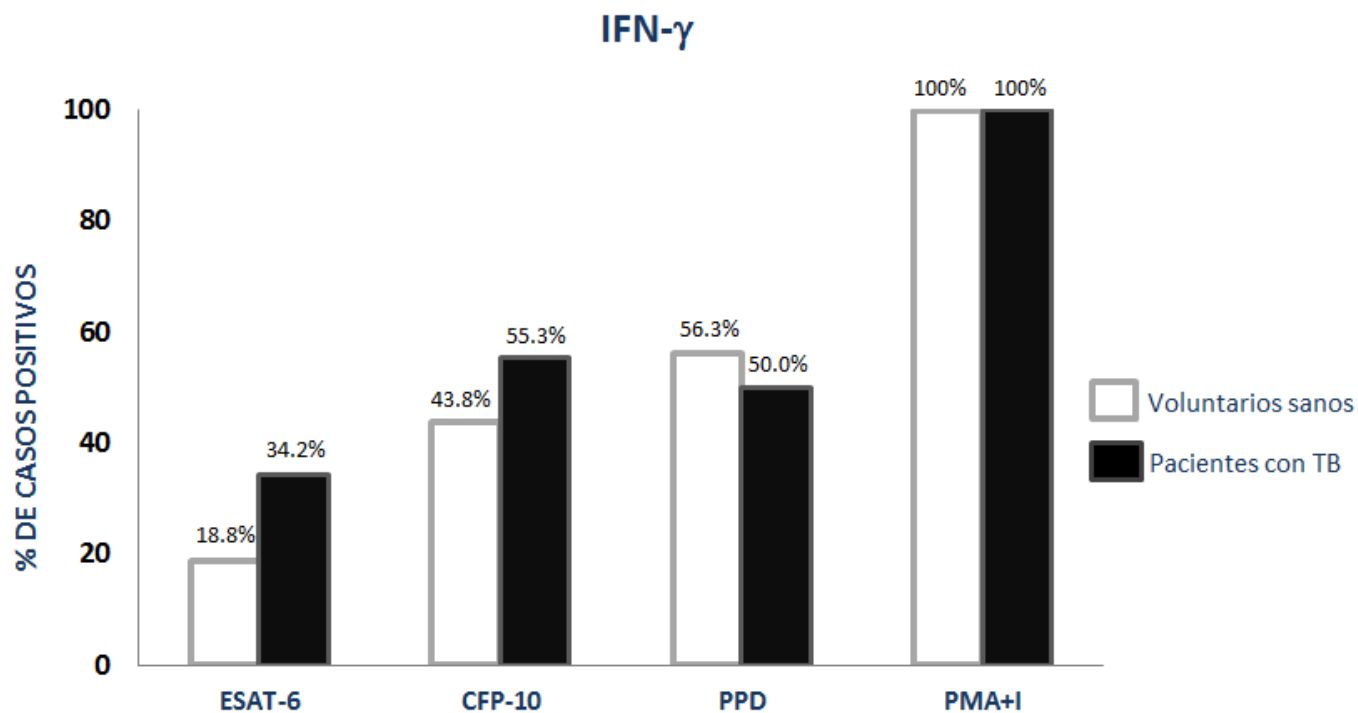


Figura 10a. Porcentaje de casos positivos para IFN- γ en células de pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos. Se colocaron las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB y de voluntarios sanos en presencia de los antígenos ESAT-6 (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml), CFP-10 (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml) o PPD (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml), utilizando PMA+I como control positivo o medio de cultivo suplementado con 10% SFB como control negativo. Las células se incubaron en presencia de los estímulos durante 20 h a 37°C, 5% CO₂, en placas de 96 pozos de ELISpot dual (sistema de Abcam). Se siguieron las instrucciones del fabricante para revelar los *spots*, mismos que se contaron en el lector de ELISpot. Los resultados se presentaron como el porcentaje de casos positivos para la producción de IFN- γ .

CMSP = células mononucleares de sangre periférica

n = 38 pacientes TB vs 16 voluntarios sanos

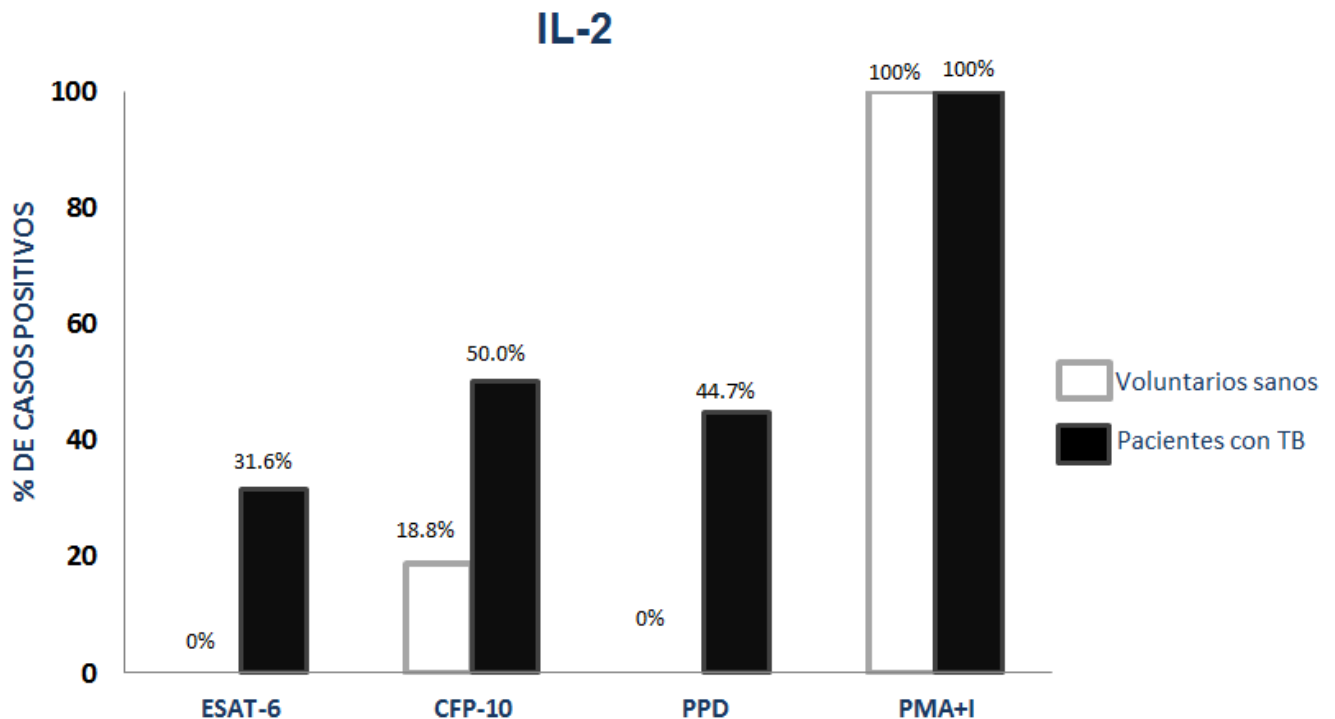


Figura 10b. Porcentaje de casos positivos para IL-2 en células de pacientes con TB pulmonar activa y voluntarios sanos. Se colocaron las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB y de voluntarios sanos en presencia de los antígenos ESAT-6 (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml), CFP-10 (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml) o PPD (100 μ l/pozo a una concentración de 10 μ g/ml), utilizando PMA+I como control positivo o medio de cultivo suplementado con 10% SFB como control negativo. Las células se incubaron en presencia de los estímulos durante 20 h a 37°C, 5% CO₂, en placas de 96 pozos de ELISpot dual (sistema de Abcam). Se siguieron las instrucciones del fabricante para revelar los spots, mismos que se contaron en el lector de ELISpot. Los resultados se presentaron como el porcentaje de casos positivos para la producción de IL-2.

CMSP = células mononucleares de sangre periférica

n = 38 pacientes TB vs 16 voluntarios sanos

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los ensayos de liberación de IFN- γ (*IGRAs; Interferon- γ Release Assays*), en particular ELISpot, son una herramienta indispensable en el diagnóstico de infección latente de tuberculosis (*LTBI*), sin embargo, esta técnica no detecta al 100 % de los casos positivos para TB. Las cifras estadísticas de morbilidad y mortalidad de esta enfermedad pueden incrementarse debido a su asociación con otras enfermedades como la diabetes y el VIH, así como por un diagnóstico erróneo que limita la detección oportuna de la enfermedad y el tratamiento inmediato.

La técnica de ELISpot dual ya ha sido utilizada en el seguimiento de la respuesta inmunológica de pacientes con VIH y ha constituido una buena herramienta en el seguimiento de la enfermedad [42], así como en la evaluación de la eficacia de nuevas vacunas, sin embargo, aún no se ha utilizado en el estudio de la TB, por lo que en este trabajo se estudió si la metodología dual es útil para diferenciar a los pacientes con TB pulmonar de los voluntarios sanos.

El primer objetivo fue establecer el inductor de la máxima estimulación celular para la producción de IFN- γ e IL-2, por lo que se comparó la fitohemaglutinina (PHA) con respecto a la mezcla de acetato de forbol-miristato con ionomicina (PMA+I) [35, 41]. Los resultados mostraron que PMA+I fue el estímulo que indujo mayor producción de IFN- γ e IL-2 tanto en los pacientes como en los voluntarios sanos. PHA y PMA+I activan a las células a través de mecanismos biológicos distintos. Por su parte, PHA activa a las células mediante su unión a TLR, mientras que PMA atraviesa la membrana celular por difusión pasiva, seguido de su unión a la Proteincinasa C y la activación del factor de transcripción NF- κ B [43]. La difusión pasiva de PMA a través de la membrana favorece que la activación celular tenga mayor efecto, en comparación con PHA. Además, la respuesta hacia PMA se mejoró con el efecto sinérgico de la Ionomicina, que es un ionóforo de calcio, cuya función es aumentar el calcio citoplasmático libre para activar a la Proteincinasa C [44].

Se compararon dos sistemas de ELISpot dual (Abcam y R&D) para determinar en cuál de ellos se obtiene el mayor número de sujetos positivos a los estímulos utilizados en este estudio. PHA y PMA+I estimularon a las células para la producción de IFN- γ sin observarse diferencias significativas entre ambos sistemas de ELISpot dual; sin embargo, en la determinación del número de células productoras de IL-2 si se observaron diferencias significativas, siendo el sistema Abcam en el que se obtuvo un mayor número de células productoras de IL-2 en respuesta a PHA, mientras que en el sistema R&D se observó mayor respuesta al estimular con PMA+I. Estos resultados se deben a los sistemas de ELISpot dual, ya que después de revelar al IFN- γ con el sustrato BCIP/NBT, en el sistema R&D se observó un color intenso en la membrana que posteriormente dificultó la cuenta de los *spots* rojos de IL-2, generados por el sustrato AEC (anexo I). Este problema no ocurrió en el sistema Abcam, ya que en éste sí fue posible distinguir ambos colores, facilitando así el conteo de las células productoras de IL-2 estimuladas con ESAT-6, CFP-10, PPD e incluso con PMA+I, y considerando que en este trabajo también se pretendía evaluar si la IL-2 podría ser un biomarcador de la infección y/o enfermedad por *M.tuberculosis*, se eligió al sistema Abcam.

Por otra parte, se esperaba que en respuesta a los estímulos ESAT-6, CFP-10 y PPD, el grupo de los pacientes presentara un mayor número de células productoras de IFN- γ en comparación con los voluntarios sanos [30, 45], sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos cuando se estimuló con CFP-10 y PPD. A pesar de que se eligieron voluntarios sanos sin ninguna enfermedad y sin antecedentes de haber padecido TB, los resultados podrían indicar un reconocimiento a los antígenos micobacterianos como consecuencia de la exposición de este grupo de estudio, quienes trabajan en el laboratorio de microbiología del INNSZ, estando expuestos a una gran cantidad de patógenos, dentro de los que se encuentran las micobacterias. En contraparte, la determinación del número de células productoras de IL-2 nos permitió diferenciar a los pacientes de los voluntarios sanos, encontrando mayor número de células productoras de esta interleucina en el grupo de los pacientes, por lo que este podría ser un buen biomarcador de la infección y/o enfermedad. Se sabe que la IL-2 es secretada por

los linfocitos T activados, cuya función principal es favorecer la proliferación celular [33]. Cuando los macrófagos alveolares han sido infectados por *M.tuberculosis* se activan y secretan quimiocinas que regulan la migración de los linfocitos T efectores específicos al sitio de la infección a través de la circulación, de tal forma que, cuando se obtiene una muestra de sangre periférica de los pacientes, purificamos sus células que, al ser estimuladas *in vitro* con los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10, producirán IL-2 como marcador de proliferación.

La técnica de ELISpot dual podría ser una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico y/o seguimiento de la infección/enfermedad por *M.tuberculosis*, pues además de que *per se* tiene una alta sensibilidad y especificidad, utilizando el ELISpot dual se puede obtener más información de la respuesta inmunológica del paciente con el mismo número de células que en la técnica de ELISpot convencional (en la que se determina el número de células que sólo producen IFN- γ), ya que la respuesta inmunológica es compleja y existe la producción de varias citocinas a la vez durante un proceso de enfermedad. Así mismo, esta característica es importante debido a que el número de células de un paciente puede estar limitado para todos los ensayos que se le realizan en el laboratorio.

Utilizando la técnica de ELISpot dual, con el mismo número de células en cada pozo es posible conocer el número de células productoras de IFN- γ y de IL-2, y teniendo un software que lo permita, también es posible conocer el número de células polifuncionales, es decir, las células que secretan las dos citocinas al mismo tiempo [42]. Algunos autores han realizado ensayos por citometría de flujo en los cuales han demostrado la presencia de células multifuncionales que producen IFN- γ , IL-2 y TNF- α en pacientes con TB [46]. Desafortunadamente, en este estudio no fue posible determinar el número de células que producen ambas citocinas al mismo tiempo, ya que por el momento no contamos con el software que realice esta función; sin embargo, sería interesante realizar este análisis para saber si nuestros resultados son más prometedores. Así mismo, sería interesante el estudio de muestras de pacientes con enfermedades respiratorias (infecciosas o no infecciosas), para

determinar la utilidad de la técnica en la discriminación entre TB pulmonar y reacciones cruzadas.

Además, aún hace falta que futuros estudios se enfoquen en un análisis de linfocitos T multifuncionales, ya que esto podría mejorar la técnica de ELISpot para utilizarla en la evaluación de nuevas terapias y nuevas vacunas, en la evaluación de la respuesta al tratamiento contra la TB, y en la evaluación del estado inmunológico de individuos con infección latente de TB que se encuentran en co-infección con VIH o con diabetes mellitus, con el fin de evitar que progresen a TB activa.

Hasta ahora y con estos resultados, la técnica de ELISpot dual para IFN- γ e IL-2 puede aplicarse en el estudio de pacientes con TB, con la confianza de que es de gran utilidad para este fin.

CONCLUSIÓN

La IL-2 demostró ser un biomarcador de la TB, al incrementar el número de células productoras de la interleucina en respuesta a los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10. La aplicación de ésta herramienta inmunológica podría contribuir al control de la TB, detectando a tiempo a los pacientes con TB pulmonar para que reciban el tratamiento de manera oportuna y hacer el seguimiento de su evolución.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Global Health Observatory (GHO). Tuberculosis** disponible en <http://www.who.int/gho/tb/en/index.html> [<http://www.who.int/gho/tb/en/index.html>]
2. WHO: **Global tuberculosis report 2012**. In., 2012 edn. U.S.A; 2012: 98.
3. Lin PL, Flynn JL: **Understanding latent tuberculosis: a moving target**. *Journal of Immunology* 2010, **185**(1):15-22.
4. Ahmad S: **Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection**. *Clinical & Developmental Immunology* 2011, **2011**:814943.
5. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL: **Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection**. *The Lancet Infectious Diseases* 2003, **3**(9):578-590.
6. Pedraza Sigifredo AR, Herrera María Teresa, Torres Martha, Bustamante Jacinta: **Infecciones por Mycobacterium y Salmonella en pacientes con inmunodeficiencias asociadas al circuito IL-12/IL-23-IFN- γ : aspectos biológicos y clínicos**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2007, **27**(3).
7. Menzies D, Al Jahdali H, Al Otaibi B: **Recent developments in treatment of latent tuberculosis infection**. *The Indian Journal of Medical Research* 2011, **133**:257-266.
8. Vinay Kumar AKA, Nelson Fausto: **Robbins & Cotran Patología Estructural y Funcional**, 7th Edition edn. Spain; 2005.
9. Silva Carlos BV, Arraiz Naylet, Bermúdez Fernando, Rodríguez Moisés, Valdelamar Lisney, Leal Elliuiz **Fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis**. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2007, **26**(001):8.
10. Borrero R, Álvarez N, Reyes F, Sarmiento ME, Acosta A: **Mycobacterium tuberculosis: factores de virulencia**. *VacciMonitor* 2011, **20**:34-38.
11. Ottenhoff TH, Kaufmann SH: **Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go?** *PLoS Pathogens* 2012, **8**(5):e1002607.
12. SSA: **Boletín epidemiológico**. In., vol. 29: SSA; 2013.
13. Latorre Rueda I: **DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR Mycobacterium tuberculosis MEDIANTE ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS T SENSIBILIZADAS CON ANTÍGENOS ESPECÍFICOS**. *Ciències Experimentals* Barcelona: UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA 2011.
14. Ortega Roque JA: **BUSQUEDA DE BIOMARCADORES EN LA INFECCION CON DIFERENTES MICOBACTERIAS**. Instituto Politecnico Nacional; 2012.
15. Hemmati M, Seghatoleslam A, Rasti M, Ebadat S, Mosavari N, Habibagahi M, Taheri M, Sardarian AR, Mostafavi-Pour Z: **Expression and Purification of Recombinant Mycobacterium Tuberculosis (TB) Antigens, ESAT-6, CFP-10 and ESAT-6/CFP-10 and Their Diagnosis Potential for Detection of TB Patients**. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2011, **13**(8):556-563.
16. Guo S, Bao L, Qin ZF, Shi XX: **The CFP-10/ESAT-6 complex of Mycobacterium tuberculosis potentiates the activation of murine macrophages involvement of IFN-gamma signaling**. *Medical Microbiology and Immunology* 2010, **199**(2):129-137.
17. Niladri Ganguly ISaPS: **Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence**. *Tuberculosis* 2008, **88**:8.
18. Ahmad S: **New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection**. *Respiratory Research* 2010, **11**:169.

19. Herrera MT, Torres M, Nevels D, Perez-Redondo CN, Ellner JJ, Sada E, Schwander SK: **Compartmentalized bronchoalveolar IFN-gamma and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis.** *Tuberculosis (Edinb)* 2009, **89**(1):38-47.
20. Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang WJ, Demaurex N, Woodside M, Tsai O, Grinstein S: **Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na⁺/H⁺ exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺-atpases.** *The Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(47):29810-29820.
21. Rojas A: **Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Segunda parte.** *Bioquímica* 2004, **29**(1):14.
22. Álvarez N, Borrero R, Reyes F, Camacho F, Mohd N, Sarmiento ME, Acosta A: **Mecanismos de evasión y persistencia de Mycobacterium tuberculosis durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente.** *VacciMonitor* 2009, **18**:18-25.
23. Pieters J: **Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance.** *Cell Host & Microbe* 2008, **3**(6):399-407.
24. Bellanti Josep EAaTG: **Immunology IV. Clinical Applications in Health and Disease.** U.S.A: I Care Press; 2012.
25. Cooper AM: **Cell-mediated immune responses in tuberculosis.** *Annual Review of Immunology* 2009, **27**:393-422.
26. Rivas Santiago B, Hernandez Pando R, Carranza C, Juarez E, Contreras JL, Aguilar Leon D, Torres M, Sada E: **Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells.** *Infection and Immunity* 2008, **76**(3):935-941.
27. Raja A: **Immunology of tuberculosis.** *The Indian Journal of Medical Research* 2004, **120**(4):213-232.
28. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW: **Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis.** *Clinical Microbiology Reviews* 2002, **15**(2):294-309.
29. Berrington WR, Hawn TR: **Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?** *Immunological Reviews* 2007, **219**:167-186.
30. Cheol-Hong Kim, Jong-Yeop Kim, Yong Il Hwang, Chang Youl Lee, Jeong-Hee Choi, Yong-Bum Park, Seung-Hun Jang, Heungjeong Woo, Dong-Gyu Kim, Myung Goo Lee, In-Gyu Hyun, Ki-Suck Jung, Hyun Soo Kim: **Interferon-γ Enzyme-Linked Immunospot Assay in patients with tuberculosis and healthy adults.** *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2014, **76**:23-29
31. Rojas A: **Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera parte.** *Bioquímica* 2004, **292**(2):13.
32. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA: **Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.** *Journal of Leukocyte Biology* 2004, **75**(2):163-189.
33. Liao W, Lin JX, Leonard WJ: **IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation.** *Current Opinion in Immunology* 2011, **23**(5):598-604.
34. Krummel B, Strassburg A, Ernst M, Reiling N, Eker B, Rath H, Hoerster R, Wappler W, Glaewe A, Schoellhorn V *et al*: **Potential role for IL-2 ELISPOT in differentiating recent and remote infection in tuberculosis contact tracing.** *PloS One* 2010, **5**(7):e11670.
35. Chiappini E, Della Bella C, Bonsignori F, Sollai S, Amedei A, Galli L, Niccolai E, Del Prete G, Singh M, D'Elios MM *et al*: **Potential role of M. tuberculosis specific IFN-gamma and IL-2 ELISPOT assays in discriminating children with active or latent tuberculosis.** *PloS One* 2012, **7**(9):e46041.

-
36. Lucia Barrera CGM, María Delfina Sequeira, María D. Sequeira, Susana Balandrano, Maritza Velazco, Ernesto Montoro, Isabel Narvaiz de Kantor, Adalberto Laszlo: **Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica.** In. Edited by Salud ORdIOMdl: Organización Panamericana para la Salud; 2008: 114.
 37. **Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis** [http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5321934&fecha=13/11/2013]
 38. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, de Boer K, Andersen P, Ottenhoff TH, van Dissel JT: **Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001, **8**(6):1089-1096.
 39. Dyrhol-Riise AM, Gran G, Wentzel-Larsen T, Blomberg B, Haanshuus CG, Morkve O: **Diagnosis and follow-up of treatment of latent tuberculosis; the utility of the QuantiFERON-TB Gold In-tube assay in outpatients from a tuberculosis low-endemic country.** *BMC Infectious Diseases* 2010, **10**:57.
 40. **Dual-Color ELISpot Human IFN-gamma/IL-2 Kit**
[<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/RSD/ELD4506.pdf>]
 41. **Interferon Gamma + IL-2 Human Elispot Kit** [<http://www.abcam.com/interferon-gamma--il2-human-ELISPOT-kit-ab48448.html>]
 42. Boulet S, Ndongala ML, Peretz Y, Boisvert MP, Boulassel MR, Tremblay C, Routy JP, Sekaly RP, Bernard NF: **A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN-gamma HIV-specific immune responses.** *Journal of Immunological Methods* 2007, **320**(1-2):18-29.
 43. Goel G, Makkar HP, Francis G, Becker K: **Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals.** *International Journal of Toxicology* 2007, **26**(4):279-288.
 44. Jarolsaw Baran, Danuta Kowalczyk, Mariola Oz 'O 'G, Marek zembala. **Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001, **8**(2):303
 45. Kellar KL, Gehrke J, Weis SE, Mahmutovic-Mayhew A, Davila B, Zajdowicz MJ, Scarborough R, LoBue PA, Lardizabal AA, Daley CL *et al*: **Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with Mycobacterium tuberculosis antigens.** *PLoS One* 2011, **6**(11):e26545.
 46. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, Galati D, Bocchino M, Matarese A, Salerno A *et al*: **Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection.** *European Journal of Immunology* 2010, **40**(8):2211-2220.

Anexo I

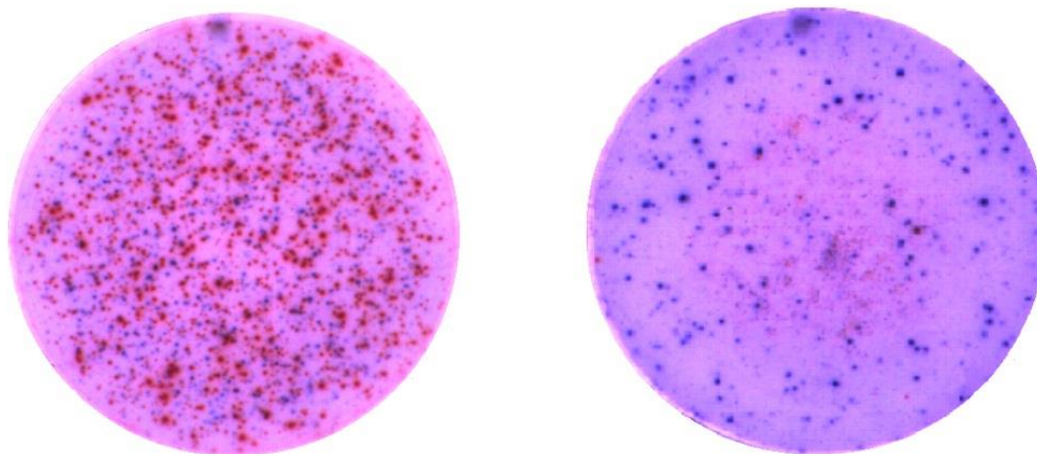


Figura 11. Imagen de un pozo representativo del ELISpot dual para IFN- γ e IL-2, sistema Abcam. Se colocaron 250 000 células mononucleares de sangre periférica de un paciente con TB por cada pozo, con los estímulos PMA+I (izquierda) o PHA (derecha), durante un tiempo de incubación de 20 h a 37°C y 5% CO₂. Se revelaron los spots de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se realizó el conteo de células secretoras de IFN- γ (rojo) e IL-2 (azul) en un lector de ELISpot. Los resultados se reportaron como unidades formadoras de manchas o spots (UFS) por cada 1×10^6 células.

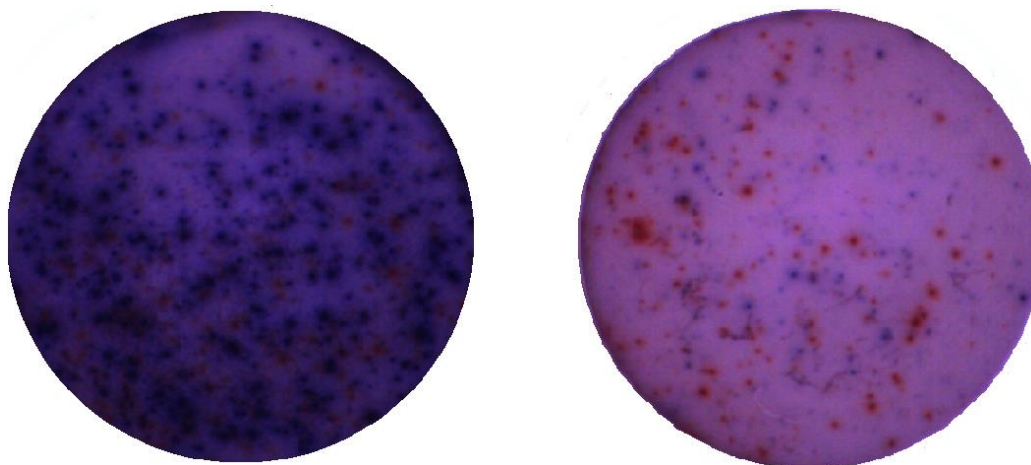


Figura 12. Imagen de un pozo representativo del ELISpot dual para IFN- γ e IL-2, sistema R&D. Se colocaron 250 000 células mononucleares de sangre periférica de un paciente con TB por cada pozo, con los estímulos PMA+I (izquierda) o PHA (derecha), durante un tiempo de incubación de 20 h a 37°C y 5% CO₂. Se revelaron los spots de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se realizó el conteo de células secretoras de IFN- γ (azul) e IL-2 (rojo) en un lector de ELISpot. Los resultados se reportaron como unidades formadoras de manchas o spots (UFS) por cada 1×10^6 células.