



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**COMPARACIÓN DEL PERFIL DE LA RESPUESTA INMUNE Y EL RIESGO DE
PROGRESIÓN A ENFERMEDAD ACTIVA EN POBLACIÓN CON INFECCIÓN
LATENTE POR *Mycobacterium bovis* CON EL PERFIL DE RESPUESTA Y RIESGO
EN INDIVIDUOS EXPUESTOS SIN EVIDENCIA DE INFECCIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ORDAZ VÁZQUEZ ANABEL

**TUTOR PRINCIPAL: DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
COMITÉ TUTOR: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, D.F.

ENERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**COMPARACIÓN DEL PERFIL DE LA RESPUESTA INMUNE Y EL RIESGO DE
PROGRESIÓN A ENFERMEDAD ACTIVA EN POBLACIÓN CON INFECCIÓN
LATENTE POR *Mycobacterium bovis* CON EL PERFIL DE RESPUESTA Y RIESGO
EN INDIVIDUOS EXPUESTOS SIN EVIDENCIA DE INFECCIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ORDAZ VÁZQUEZ ANABEL

**TUTOR PRINCIPAL: DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**COMITÉ TUTOR: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, D.F.

ENERO 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de octubre de 2014, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ORDAZ VÁZQUEZ ANABEL** con número de cuenta **513014569**, con la tesis titulada **"COMPARACIÓN DEL PERFIL DE LA RESPUESTA INMUNE Y EL RIESGO DE PROGRESIÓN A ENFERMEDAD ACTIVA EN POBLACIÓN CON INFECCIÓN LATENTE POR *Mycobacterium bovis* CON EL PERFIL DE RESPUESTA Y RIESGO EN INDIVIDUOS EXPUESTOS SIN EVIDENCIA DE INFECCIÓN"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE**:

Presidente: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
Vocal: DRA. MARTHA TORRES ROJAS
Secretario: DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de diciembre de 2015


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme todo lo necesario para mi formación académica y el conocimiento transmitido a través de su excelente platilla de profesores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de Becario 280577) por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

A mi tutora la Dra. Miriam Bobadilla del Valle, mi más sincero agradecimiento y admiración por su apoyo, paciencia y excelente dirección.

Al comité tutorial, la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón y la Dra. Ma. del Rocío Reyes Montes por la asesoría brindada durante el desarrollo de la tesis.

A los integrantes del jurado: Dr. Edgar Zenteno, Dra. Martha Torres, Dra. Diana Aguilar, Dra. Isabel Sada y Dra. Ma. del Rocío Reyes por el tiempo que dedicaron en la revisión de esta tesis, sus consejos, críticas las cuales enriquecieron mi formación y por sobre todo su paciencia.

Agradecimientos personales

No quisiera olvidar a nadie pero el espacio es pequeño y los agradecimientos muchos.

A la Dra. Miriam Bobadilla agradezco la confianza puesta en mí, su respaldo, su consejo, su amistad, el conocimiento compartido, el amor por las micobacterias, por enseñarme más que ciencia y por su paciencia para conmigo. Mi más profunda admiración como persona y la humildad de su corazón, como jefa por lograr todo lo que ha logrado y como tutora, por hacernos ver el vaso siempre medio lleno y que el enemigo de lo excelente es lo bueno. ¡Eso sí!

A todos en el Laboratorio Nacional de Máxima Seguridad para el Estudio de la Tuberculosis y Enfermedades Emergentes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, que han hecho incomparable mi estadía en el laboratorio, deben saber que realizan un trabajo admirable. En especial a mis amigos más entrañables: Barbarita, Dámaris, Ivoncita, Paty, Sr. Luis y Paco por alentarme en todo momento, aguantarme este tiempo y por su amistad, son mis paleros favoritos!!!

Al Laboratorio de Microbiología de la Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en especial a la Dra. Martha Torres y la Dra. Yolanda González por haberme permitido un espacio en su laboratorio para realizar mis experimentos y apoyarme con su conocimiento sobre citometría de flujo.

A todos aquellos que me brindaron su ayuda y amistad en algún momento, y cuando digo todos, me refiero a todos.

Y sobre todo gracias al más grande amor que conozco, a Dios por cumplir cada anhelo de mi corazón.

Dedicatoria

A mis papás, Alfonso Ordaz y Celina Vázquez por su amor, por todo su apoyo, su sabio consejo, por enseñarme a que no hay nada imposible, por respaldar cada decisión, por confiar en mí y por sembrar en mí la buena semilla.

A mis hermanos, Maruxa y Abraham por soportarme, por compartir cada sueño conmigo, por su amor y paciencia, recuerden que siempre serán una inspiración para mí.

A mis hermanos por ley, Goyo y Nancy por todo el cariño brindado, el apoyo y por amar a mis herman@s, sin ustedes nuestra familia no estaría completa.

A los hombres de mi vida, “mis lagartijos”: Abraham, Israel, Caleb y Elieser, simplemente los amo.

INDICE	Página
INDICE DE FIGURAS.....	i
INDICE DE TABLAS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Definición	3
1.2 Características generales de <i>M. tuberculosis</i>	3
1.3 Aspectos clínicos de la tuberculosis. Historia natural y patogenia	4
1.4 Pruebas utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis	5
1.4.1 Baciloscopia y cultivo.....	5
1.4.2 Pruebas de escrutinio	6
1.4.3 Ensayo de liberación de IFN- γ	7
2 MARCO TEORICO	7
2.1 Epidemiología de la tuberculosis en el mundo	7
2.2 Situación de la tuberculosis en América.....	8
2.3 Situación de la tuberculosis en México	8
2.4 Descripción de los genomas de <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	9
2.5 Tuberculosis por <i>M. bovis</i> (zoonosis).....	10
2.6 Infección por <i>Mycobacterium bovis</i> en humanos	11
2.7 Situación de la infección por <i>Mycobacterium bovis</i> en México.....	11
2.8 Papel de la respuesta inmune mediada por células en la tuberculosis	12
2.9 Descripción de las principales poblaciones contra la infección por <i>M. tuberculosis</i>	14
2.9.1 Linfocitos T CD4 cooperadores	14
2.9.2 Linfocitos T CD8 citotóxicos	15
2.9.3 Células Th17.....	16
2.10 Antígenos micobacterianos ESAT-6 y CFP-10	17
2.11 Derivado proteico purificado.....	18
2.12 Evaluación de células T antígeno específico	18
3 ANTECEDENTES.....	20
4 JUSTIFICACIÓN.....	22

5	HIPÓTESIS.....	23
6	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
7	OBJETIVO GENERAL.....	23
8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
9	MÉTODO.....	24
9.1	Diseño del estudio.....	24
9.2	Población de estudio.....	24
9.3	Criterios de selección de los individuos:.....	24
9.4	Criterios de exclusión.....	24
9.5	Grupos a estudiar de esta población:.....	24
10	METODOLOGÍA.....	25
10.1	Obtención de resultados de las pruebas de TST e IGRA.....	25
10.2	Separación y congelación de PBMC.....	25
10.3	Descongelación de PBMC y evaluación de viabilidad por azul de tripán.....	25
10.5	Evaluación de la viabilidad celular.....	26
10.6	Identificación de linfocitos Th1, Th17 y Treg.....	26
10.7	Estrategia de análisis para la evaluación de células Th1, Th17 y Treg.....	27
10.8	Análisis estadístico.....	28
11	RESULTADOS.....	32
12	DISCUSIÓN.....	46
13	CONCLUSIONES.....	51
14	LITERATURA CITADA.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Tasa de la incidencia mundial de tuberculosis estimada en 2013	8
Fig. 2. Árbol filogenético del CMTB determinado a partir del análisis de la presencia y/o ausencia de regiones suprimidas y de polimorfismos de ADN en genes seleccionados.....	9
Fig. 3. Modo de transmisión de <i>Mycobacterium bovis</i>	10
Fig. 4. Componentes de la inmunidad innata e inmunidad celular en los espacios bronquioalveolares en respuesta a la infección por micobacterias	14
Fig. 5. Estrategia de análisis para la selección de poblaciones de células T CD4, CD8, productoras de citocinas y células Treg..	31
Fig. 6. Análisis de la viabilidad de las PBMC por exclusión con azul de tripano.. .	33
Fig. 7. Determinación de la concentración de antígenos	34
Fig. 8. Curvas de titulación de Ac	34
Fig. 9. Viabilidad de células CD3+ antígeno específico	35
Fig. 10. Determinación de células T CD4 y CD8.....	35
Fig. 11. Determinación de la proporción de células CD4+CD25+.....	37
Fig. 12. Determinación de la proporción de células CD4+IFN- γ +	38
Fig. 13. Determinación de la proporción de células CD8+IFN- γ +	40
Fig. 14. Determinación de la proporción de células CD4+IL-17A+	41
Fig. 15. Determinación de la proporción de células CD8+IL-17A+	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características sociodemográficas y clínicas del grupo de individuos seleccionados.....	32
Tabla 2 Distribución de los individuos de acuerdo con los resultados obtenidos por las pruebas TST e IGRA.	32
Tabla 3 Resultados de las poblaciones estudiadas en base a las pruebas TST e IGRA	45

ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CAIT	Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo
CFP-10	Proteína de Filtrado de Cultivo 10 kDa
CMTB	Complejo Mycobacterium tuberculosis
CPA	Célula presentadora de antígeno
DC	Célula dendrítica
DM	Diabetes mellitus
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ESAT-6	Antígeno de Secreción Temprana 6 kDa
FSC	Dispersión de luz dada hacia adelante
IGRA	Ensayo de liberación de interferón gamma
LJ	Löwenstein-Jensen
MDR	Multi-drogo resistente
MGIT	Tubo indicador de crecimiento de micobacterias
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MNT	Micobacterias no tuberculosas
NK	Células asesinas naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PPD	Derivado proteico purificado
RD	Región de Diferenciación
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SFB	Suero fetal bovino
SFU	Unidades formadoras de Spots
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
SSC	Dispersión de luz lateral
Tb	Tuberculosis
TBb	Tuberculosis bovina
TLR	Receptor tipo Toll
Treg	Células T reguladoras
TST	Prueba cutánea de tuberculina
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ZN	Ziehl-Neelsen

RESUMEN

M. bovis como agente causal de tuberculosis (Tb) en el humano, ha demostrado ser un riesgo para la salud pública. Las pruebas inmunológicas, tuberculina (TST) y el ensayo de liberación de IFN- γ (IGRA) hasta ahora se han utilizado para conocer la exposición al bacilo, el resultado positivo de alguna de estas pruebas se considera como Tb latente, sin embargo, en zonas con alta prevalencia de Tb, dichas pruebas son difíciles de interpretar. Se ha observado que ciertas poblaciones celulares se encuentran con mayor frecuencia en Tb activa, por ello el objetivo de este estudio fue determinar el perfil inmunológico de una población de trabajadores con TST+/TST- e IGRA+/IGRA- expuestos a ganado infectado por *M. bovis*. Se analizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) criopreservadas de 24 trabajadores expuestos a ganado bovino infectado por *M. bovis*, con resultados disponibles de TST e IGRA. Las PBMC específicas de antígeno fueron expandidas con antígenos del complejo *M. tuberculosis* ESAT-6, CFP-10, PPD + anti-CD28 durante 7 días. Posteriormente, se caracterizaron las poblaciones de células T productoras de IFN- γ e IL-17 utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD3, CD8, CD4 y CD25 y el fenotipo se evaluó con la adición de anticuerpos contra IFN- γ y IL-17. Fueron adquiridas 400,000 células por condición en un citometro FACSCanto II, los resultados se analizaron en el programa FlowJo[®]. Se observó variabilidad en los perfiles inmunológicos de cada grupo de individuos estudiado, el PPD mostró mayor capacidad de inducir activación y producción de citocinas. Asimismo, se observó en este modelo que los antígenos CFP-10 y ESAT-6 tuvieron un efecto inhibitor en la producción de citocinas. Se pudo definir que los individuos con resultado positivo para ambas pruebas de TST e IGRA fueron verdaderos latentes.

ABSTRACT

M. bovis as a causative agent of tuberculosis (TB) in humans has been shown to be a risk to public health. Immunological tests, tuberculin (TST) and the IFN- γ release of assay (IGRA) until now have been used to know bacillus exposure, the positive result of any of these tests is considered latent TB, and however in areas with high prevalence of TB, these tests are difficult to interpret. It has been observed that certain cell populations are found most often in active Tb, so the aim of this study was to determine the immune profile of a population of workers with TST + / TST- and IGRA + / IGRA- exposed to *M. bovis* infected cattle. Peripheral cryopreserved blood mononuclear cells (PBMC) from 24 workers exposed to infected cattle by *M. bovis*, with TST and IGRA results available were analyzed. PBMC antigen-specific cells were expanded with *M. tuberculosis* antigens ESAT-6, CFP-10, PPD + anti-CD28 for 7 days. Subsequently, populations of T cells producing IFN- γ and IL-17 using anti-CD3, CD8, CD4 and CD25 mAb and the phenotype was assessed by the addition of antibodies against IFN- γ and IL-17 were characterized. They were acquired 400,000 cells per condition in a FACSCanto II cytometer; the results were analyzed in the FlowJo® program. Variability was observed in the immunological profiles of each group of individuals studied, the PPD showed higher capacity to induce activation and production of cytokines. It was also noted that in this model CFP-10 and ESAT-6 antigen had an inhibitory effect on the production of cytokines. It could define that individuals with both positive test result for TST and IGRA were true latent.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Definición

La tuberculosis (Tb) es una infección bacteriana ocasionada por cualquier microorganismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), afecta principalmente los pulmones, sin embargo, puede afectar el sistema nervioso central, linfático, circulatorio, genitourinario, el aparato digestivo, huesos, articulaciones e incluso la piel [1]. Desde 1994 es considerada como una enfermedad re-emergente a nivel mundial; sin embargo, en México es una enfermedad endémica, la cual aún no ha sido posible erradicar [2].

El CMTB está formado por un grupo de micobacterias que se encuentran estrechamente relacionadas. Comprende siete especies y sub-especies, *M. tuberculosis* que infectan principalmente a humanos, *M. bovis* (incluido el bacilo de Calmette-Guérin o BCG utilizado en la vacunación), *M. africanum* huésped de humanos en África ecuatorial, *M. canettii* huésped de humanos, *M. microti*, huésped de ratas, *M. caprae* que infecta a cabras y *M. pinnipedii* con capacidad de causar patologías en distintos hospederos [3]. El agente etiológico más común de la Tb es *Mycobacterium tuberculosis*, aunque *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* y *M. microti* también se asocian a la Tb, sobre todo en individuos con algún tipo de compromiso inmunológico [4].

En la actualidad, se ha logrado completar la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, y se ha encontrado que a pesar de que existe un parentesco genético cercano, se conservan diferencias biológicas propias en cada especie, como es el caso de *M. bovis* con mayor tropismo hacia el ganado bovino [5, 6]; sin embargo, hay un importante número de casos en humanos infectados por dicho microorganismo, a diferencia de la especie *M. tuberculosis* que causa patología conocida solamente en humanos [7].

1.2 Características generales de *M. tuberculosis*

La palabra *Mycobacterium* deriva del prefijo griego "myces" que significa tanto hongo como cera y "bakterium" que significa pequeño bastón [1]. Las bacterias que forman parte del CMTB son microorganismos aerobios, no formadores de esporas y no móviles. Cuentan con una pared celular que está compuesta por tres macromoléculas unidas covalentemente entre cada una (peptidoglicano, arabinogalactano y ácido micólico); así como lipopolisacárido y lipoarabinomano, que se cree establecen uniones a la membrana plasmática [8]. El ácido micólico, es un ácido graso beta hidroxilado, que constituye la pared celular y ocupa aproximadamente el 50% del peso de la misma; esta estructura es

la encargada de definir el género y las clasifica como bacterias ácido-alcohol resistentes, por lo que se tiñen mejor por el método de Ziehl-Neelsen (ZN), y se observan de color rojo intenso [9].

Su crecimiento es lento, con un tiempo de generación aproximada de 15 a 20 h, en comparación con otras bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella*, que es aproximadamente de 20-25 min; su crecimiento visible requiere de 3 a 8 semanas en medio sólido. La morfología colonial de micobacterias del CMTB en medios sólidos se observan como colonias rugosas, secas, a veces con una superficie nodular o rugosa, mientras en la morfología microscópica se observa que crecen en grupos paralelos, lo que da una forma de cordones serpenteantes característicos [10].

1.3 Aspectos clínicos de la tuberculosis. Historia natural y patogenia

La principal vía de entrada de la micobacteria al hospedero es la aérea. Una vez internalizadas las bacterias, estas son fagocitadas por macrófagos alveolares; dentro de los cuales el bacilo se multiplica. Algunos bacilos alcanzan la circulación linfática o hematógena y se diseminan a otras regiones del organismo. La diseminación ocurre en un término de tres a diez semanas, periodo en el que se origina la hipersensibilidad a las proteínas del bacilo y una respuesta inmune mediada por células [11]. En la mayoría de los individuos infectados los bacilos son destruidos, algunos de ellos permanecen en estado latente dentro de los macrófagos, ganglios, y nódulos fibróticos o en calcificación, y años más tarde pueden llegar a causar enfermedad. El riesgo de desarrollar Tb activa es mayor en los primeros cinco años después de la primo-infección. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se asocia con el desarrollo de Tb activa con un tiempo de evolución acelerado y la presentación atípica de la enfermedad debido a la afectación de células del sistema inmune, con formas de diseminación hematógena [12].

La Tb latente es clásicamente definida como la sensibilización inmune a *M. tuberculosis* en ausencia de manifestaciones clínicas de enfermedad activa como fiebre, escalofríos, sudoración nocturna, pérdida de peso, tos, hemoptisis, o una nueva opacidad en placa de tórax. Dicha sensibilización es evaluada por la reactividad a la prueba cutánea de la tuberculina (TST) o el ensayo de liberación de IFN- γ (IGRA), un resultado positivo de cualquiera de las dos pruebas indican Tb latente[11].

La causa más frecuente de Tb activa es la reactivación y se debe principalmente a una falla en la inmunidad del individuo, dicha inmunidad es aprovechada por el bacilo reactivando su replicación, se incrementa el número de bacilos, la

inflamación, se produce necrosis licuefactiva y se forman cavernas que se localizan fundamentalmente en los segmentos broncopulmonares posteriores de los lóbulos superiores. En el 80% de los casos se manifiesta con tos y expectoración, fiebre o febrícula, pérdida de peso, dificultad respiratoria y hemoptisis. En las formas pulmonares, por lo general, la baciloscopia es positiva en expectoración o lavado bronquioalveolar [12].

A nivel sistémico también puede producir fiebre y sudores, ambos de predominio vespertino, o bien, pérdida de peso. Dentro de la afección extra-pulmonar se presentan adenopatías; éstas son grandes, duras y ligeramente dolorosas, incluso pueden verter su contenido al exterior. A nivel gastrointestinal se puede presentar dolor abdominal, ascitis, diarrea crónica sin características inflamatorias; a nivel genitourinario pueden presentar disuria, hematuria microscópica y leucocituria estéril. También hay presentaciones menos frecuentes como son la meníngea, ocular u ósea, formas cuya protección es mediada por la vacunación con BCG [12].

En los exámenes de sangre en individuos con Tb activa se observan anomalías en los exámenes de laboratorio, como alteraciones en los electrolitos (hiponatremia), lo cual se debe a la secreción inapropiada de hormona antidiurética; hipercalcemia por alteración en el metabolismo de la vitamina D. Así mismo, en las infecciones tardías y graves se observan alteraciones en la biometría hemática, como anemia, leucocitosis y monocitosis [13].

1.4 Pruebas utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis

Para realizar el diagnóstico de Tb en el paciente se necesita revisar el cuadro clínico, radiografía de tórax y posteriormente realizar tres baciloscopias consecutivas y el cultivo.

1.4.1 Baciloscopia y cultivo

El diagnóstico de la Tb se realiza mediante de la baciloscopia en tres muestras de expectoración y el cultivo de acuerdo a la norma para la prevención y control de la tuberculosis (NOM-006-SSA2-2013). La tinción de ZN tiene una sensibilidad que varía de 22-78% y especificidad del 95-99% [10]. La sensibilidad es baja debido a que se requieren de 5,000 bacilos/mL de expectoración para observarla positiva [14,15].

El cultivo es en la actualidad el método diagnóstico definitivo, se debe realizar en un medio sólido y en uno líquido. Entre los medios de cultivo sólidos están el Lowenstein-Jensen (LJ) y el agar Middlebrook-Cohn (7H10 agar), entre los medios de cultivo líquidos existen el Middlebrook-Dubois (caldo 7H9).

Actualmente, se utilizan medios líquidos para realizar el cultivo en sistemas automatizados comerciales. Entre ellos se encuentran el medio MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube), MB/BACT, ESP/MYCO los cuales disminuyen el tiempo de incubación de 56 días a 14-28 días [10].

1.4.2 Pruebas de escrutinio

Existen pruebas de escrutinio que permiten determinar si un paciente ha estado en contacto con el bacilo de la tuberculosis, una de ellas es la prueba TST y el IGRA.

Las personas que han estado en contacto con el bacilo de la tuberculosis se pueden identificar mediante la prueba de TST, seis a ocho semanas después de la exposición. La TST es una prueba basada en la reacción de hipersensibilidad retardada (tipo IV) en respuesta a una mezcla compleja de antígenos de *M. tuberculosis* conocida como PPD (Derivado Proteico Purificado). Esto se debe a la acumulación de células T CD4 después de la estimulación cutánea con el PPD y se tiene predominantemente un fenotipo de memoria CD45 RO [16]. Muchos factores distintos a la infección por Tb influyen en el resultado a la prueba de TST [17].

Una prueba TST+ es resultado de la observación de induración mayor de 10 mm en el sitio de aplicación, observada después de 48 a 72 horas. La TST no puede distinguir la infección por microorganismos del CMTB y la sensibilización con otras micobacterias ambientales, debido a la reactividad cruzada ocasionada por exposición a este tipo de organismos [18,19]. La sensibilidad de la prueba es de alrededor de 65% y su especificidad de 75% [18].

Los resultados falsos negativos de la prueba, pueden deberse a una exposición reciente y a la edad. Existen estudios que mencionan que los niños, ancianos, personas inmunocomprometidas e individuos naturalmente resistentes dan resultados negativos a la TST pero están en riesgo de progresión a enfermedad activa [20]. En un estudio de pacientes con Tb confirmada por cultivo y resultado negativo de la prueba de TST, se mostró una condición donde se ve que la sensibilidad de la prueba se encuentra disminuida en pacientes con enfermedad activa crónica, anergia e inmunocompromiso [21].

Los resultados de TST falsos positivos, pueden ocurrir en aquellos individuos vacunados con BCG, la respuesta generalmente dura unos cuantos años después de la vacunación, están en un rango moderado de 5 a 10 mm de induración y en aquellos que han sido sensibilizados a estos antígenos comunes a través de la exposición a micobacterias ambientales no tuberculosas (MNT) [18].

1.4.3 Ensayo de liberación de IFN- γ

Recientemente, en países desarrollados se ha establecido que la prueba de IGRA es útil para determinar si un paciente tiene Tb latente. Esta prueba está basada en la medición de la secreción de interferón- γ (IFN- γ) por células T de sangre periférica ante la re-estimulación con antígenos específicos de *M. tuberculosis* como el antígeno de secreción temprana de las proteínas ESAT-6 (6 kDa), CFP-10 (10kD) y TB7.7. Estas proteínas están codificadas por genes deletados en la cepa vacunal de *M. bovis* BCG (no obstante se encuentra presente en las cepas silvestres de *M. bovis*), por lo que la inmunización, a diferencia de la TST, no ocasiona resultados falsos positivos [17]. Algunos autores han encontrado que la sensibilidad del IGRA para la detección de Tb activa es de aproximadamente 85%, y la especificidad para la detección de Tb activa y Tb latente es mayor de 85% y de 98-100% respectivamente [22,23].

2 MARCO TEORICO

2.1 Epidemiología de la tuberculosis en el mundo

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que la Tb, es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso después de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En el 2013, aproximadamente 64% de los 9 millones estimados de casos que contrajeron la Tb fueron notificados como recién diagnosticados, de los cuales 1.5 millones murieron por esta causa. La tasa de incidencia de la Tb en el mundo está disminuyendo aproximadamente 2% al año [2].

De las personas que contrajeron Tb en 2013, las tasas de prevalencia más altas se observaron en el Sudeste Asiático y al Pacífico Occidental con 56%, y una cuarta parte al continente Africano. Por otro lado, la India y China representaron el 24% y el 11% de los casos, respectivamente. La tasa mundial de mortalidad de Tb se redujo en un 45% entre 1990 y 2013. Sin embargo, algunos países, principalmente el continente Africano, Sudeste Asiático y algunos del continente Europeo **Fig. 1** no están reduciendo la incidencia, la prevalencia y la mortalidad al nivel que requieren las metas. Entre las causas principales de este problema, se encuentran la escasez de recursos y la epidemia generalizada de VIH/SIDA [2].

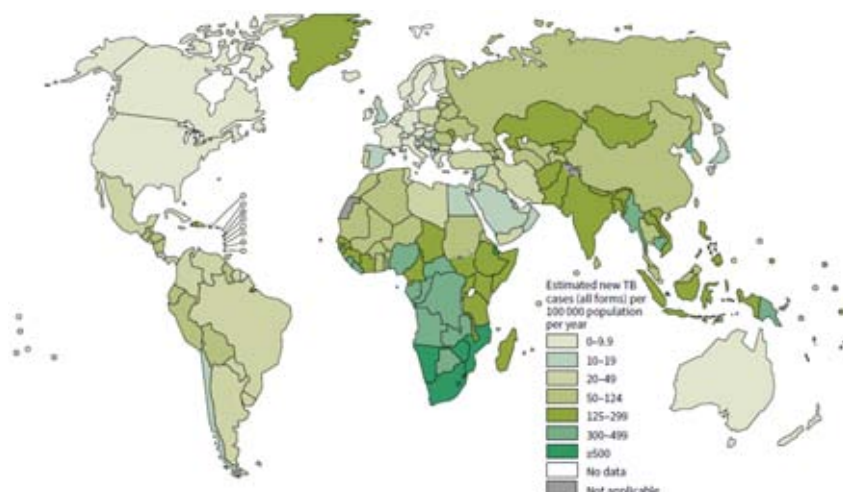


Fig. 1 Tasa de la incidencia mundial de tuberculosis estimada en 2013 (Tomado del Reporte global 2014)

2.2 Situación de la tuberculosis en América

En el año 2013 solo el 3% de los casos estimados a nivel mundial ocurrieron en América. La mayoría de los países de América tienen tasas por debajo de 50 casos por 100 000 habitantes por año, es la región con la carga más baja de Tb en promedio. En el año 2013 se produjeron unos 231,330 casos nuevos de Tb en América, lo que equivale a 29 casos/100,000 habitantes. Se notificaron 129,469 casos nuevos de Tb pulmonar confirmados por bacteriología, 42,365 por clínica y 33,777 casos de Tb extra-pulmonar. En el 2013, dos tercios (62%) de todos los casos nuevos de Tb tuvieron lugar en Brasil, Perú, México y Haití [24].

2.3 Situación de la tuberculosis en México

De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología para el 2013 se registraron en México, 21,381 casos de Tb en todas sus formas (nuevos y previamente tratados), y la incidencia fue de 19,738 casos. La tasa de incidencia estimada al cierre de 2013 fue de 21 casos y una mortalidad de 1.8 por cada 100,000 habitantes. En la presentación de la enfermedad, 81.7% fue Tb pulmonar, 1.4% Tb meníngea, 5.2% de Tb ganglionar y 11.7% Tb extra-pulmonar. Además, el 52% de los casos reportados se presentan con alguna co-morbilidad: 21% con diabetes mellitus (DM), 50% Tb multi-drogo resistente (MDR) con DM, 10.3% desnutrición, 4-6% SIDA y 8% abuso de alcohol y drogas. Del total de casos nuevos reportados por los países del continente Americano, México aportó el 9.1% de todos ellos, que lo ubica en el tercer lugar, después de Brasil y Perú [25].

2.5 Tuberculosis por *M. bovis* (zoonosis)

La fuente más común de infección por *M. bovis* en el humano es por el consumo de productos lácteos no pasteurizados. Aunque sólo alrededor del 1% de ganado con tuberculosis tiene mastitis abierta y excreta bacilos en leche, la práctica de almacenar la leche de varios animales, o incluso de varios establos en bidones, aumenta la probabilidad de la contaminación de la leche a partir de un pequeño número de animales enfermos **Fig. 3** [27]. *M. bovis* se transmite de animales infectados a humanos principalmente por inhalación de aerosoles contaminados producidos por animales enfermos, especialmente ganado vacuno y por inoculación traumática [28].

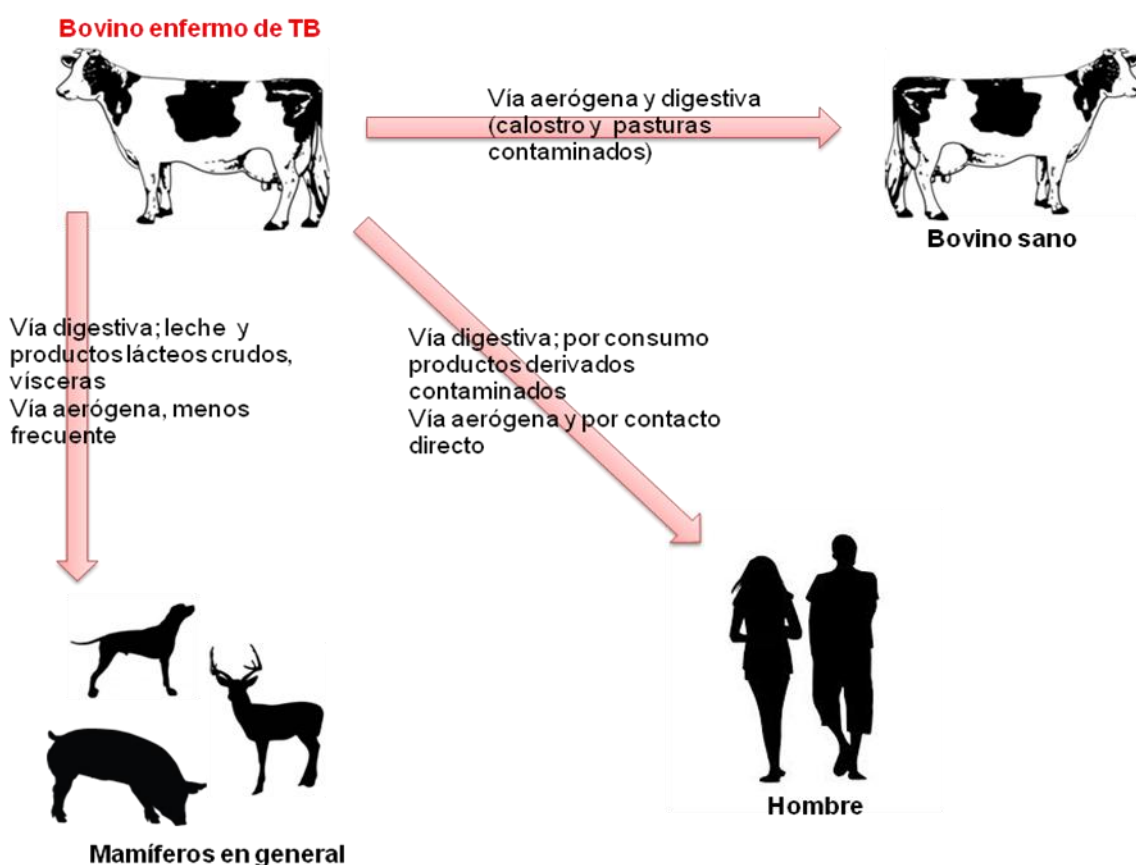


Fig. 3. Modo de transmisión de *Mycobacterium bovis* (Tomado y modificado de Acha, 2001)

Aunque los programas de control de la Tb y la pasteurización de leche han contribuido a la disminución del riesgo de transmisión de la enfermedad por el consumo de leche, su importación de otras regiones plantean un riesgo para la salud. Entre 2001 y 2004, se reportaron 35 casos de Tb en la ciudad de Nueva York, de los cuales alrededor del 1% fueron por *M. bovis*, la mayoría de los pacientes fueron de origen Mexicano o de América del Sur, e informaron haber

consumido queso sin pasteurizar importado de México, por lo que concluyeron que *M. bovis* puede sobrevivir hasta por 100 días en mantequilla y casi 1 año en algunos quesos elaborados con leche sin pasteurizar [29].

La infección también ocurre por contacto directo con heridas, como puede ocurrir en aquellos trabajadores que manipulan cadáveres y carne contaminada en los mataderos y carnicerías. Las lesiones resultantes, generalmente son en la piel debido a la inoculación traumática de bacilos y se denominan verrugas de carniceros [28].

2.6 Infección por *Mycobacterium bovis* en humanos

La Tb en humanos ocasionada por *M. bovis* es clínica e histopatológicamente indistinguible de los casos ocasionados por *M. tuberculosis* [30]. En la primera mitad del siglo XX en países desarrollados de Europa central, la tuberculosis bovina (TBb) era considerada uno de los principales problemas de salud pública veterinaria, y un porcentaje significativo de casos de Tb en humanos fue causado por *M. bovis*, especialmente en niños y granjeros en zonas rurales. El número de casos reportado por 10 países miembros de la unión europea entre 1996-2003 fue de 60 casos por año [31]. En contraste, se especula que cerca de 7,000 casos nuevos pueden estar ocurriendo en América latina cada año [32]. La OMS reportó en 1998 que 3.1% de casos de Tb en humanos fueron causados por *M. bovis* y que el 0.4-10% fueron aislados de expectoración en países africanos, a pesar de tener mayor asociación con enfermedad extra-pulmonar en humanos [33].

2.7 Situación de la infección por *Mycobacterium bovis* en México

En las últimas dos décadas, la infección en humanos por este microorganismo ha tenido un incremento en la proporción de 0.5 a 7.2% de todos los pacientes con confirmación bacteriológica de Tb, al menos en países industrializados [34]. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, la infección por *M. bovis* sigue constituyendo un problema de salud pública [6, 35]; debido a la prevalencia de la enfermedad en el ganado bovino y a la poca capacidad de los laboratorios en aislar y diferenciar este microorganismo de las otras bacterias que conforman el CMTB; así pues, los casos de Tb humana atribuida a *M. bovis* en la mayoría de estos países es desconocida y se cree que debe ser mayor que la reportada en los países industrializados [36].

Mientras que en países desarrollados la ocurrencia de infección por *M. bovis* se correlaciona con factores como: la etnicidad, prácticas culturales y religiosas, al igual que factores socio-económicos, en México el riesgo de enfermedad por *M. bovis* se ve incrementado por el consumo sobre todo de leche y productos lácteos

no pasteurizados procedentes de hatos con Tb no controlada, la exposición a la infección por aerosoles con ganado infectado en ganaderos, personal veterinario y carniceros [35]. Müller y cols., realizaron en 2013 un estudio longitudinal, observaron que en México la media del porcentaje es de 7.6% (rango de 0-31.6%) de casos por *M. bovis* en humanos, con una proporción >10% en tres estudios independientes, y la proporción mayor fue reportada en áreas específicas de México [37]. Recientemente, en el INCMNSZ se analizaron 15 años de casos de tuberculosis, hubo 1139 casos de los cuales el 26% fueron causados por *M. bovis* [38].

En México, la prevalencia estimada varía de 11 a 25 casos por cada 100 mil habitantes. Sin embargo, considerando que los métodos de identificación fenotípicos no son sensibles ni específicos, hay una subestimación del 40%, es decir que sólo se detecta uno de cada cuatro casos nuevos. Los estados del centro conforman la principal zona lechera de México. En estos estados se producen en promedio 1,400,000 litros de leche al año, 30% de la cual se vende como leche cruda no pasteurizada, lo que implica un riesgo elevado para adquirir la enfermedad [39].

2.8 Papel de la respuesta inmune mediada por células en la tuberculosis

En el caso de la infección por *M. bovis* en humanos, se desconoce su comportamiento durante la infección latente así como los factores de riesgo para su reactivación, se asume que su comportamiento es similar a la infección por *M. tuberculosis*.

La inmunopatogenia de la Tb inicia con la inhalación de aerosoles que contienen numerosos bacilos. Estos pueden ser fagocitados por células de la respuesta innata (principalmente macrófagos alveolares y células dendríticas) que funcionan como células presentadoras de antígeno (CPA). Los bacilos fagocitados son degradados por hidrolasas ácidas intralisosomales posterior a la fusión con el fago-lisosoma, con la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, además de la producción de IFN- γ , TNF- α y la apoptosis de las células infectadas. La inmunidad logra contener la infección en la mayoría de los casos, y en el resto, el bacilo sobrevive y se multiplica dentro de las CPA e induce la producción de mediadores inmunológicos. El desarrollo de la respuesta efectora por linfocitos T requiere la diseminación del bacilo vivo o antígenos bacterianos presentados por CPA que migran a ganglios linfáticos cercanos. La presentación de antígenos a células T se lleva a cabo a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo II hacia los linfocitos T CD4 y a través del MHC tipo I a los linfocitos T CD8, los cuales migran al sitio de infección en 15-18 días después de la infección.

Estas células liberan IFN- γ , esencial para la activación de fagocitos, la presentación de antígenos, y promueve la proliferación, la adhesión y la apoptosis celular. De igual manera, se ha observado que otros subtipos celulares como son los neutrófilos, también contribuyen en la fagocitosis y la transportación de los bacilos para su presentación en los ganglios linfáticos [11].

El reclutamiento de las CPA depende de la producción de un gradiente de quimiocinas, entre las principales esta la IL-17, producida por células Th17. Otras células importantes en la respuesta inmune innata contra Tb son las células asesinas naturales (NK), que intervienen en la actividad citotóxica, reconocen y eliminan macrófagos infectados, producen cantidades significativas de IFN- γ e IL-22 entre otras citocinas. En esta etapa de la respuesta inmune se han activado también, linfocitos T CD4, CD8, y un subtipo particular de linfocitos T llamados células T reguladoras (Treg), las cuales ejercen función inhibidora y anti-inflamatoria sobre células Th1, a través de la secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, TGF- β , quimiocinas como CCL4 o bien mecanismos dependientes de contacto célula-célula [11, 40].

Las células dendríticas (DC) son activadas a través de los receptores tipo “toll” (TLR) y los monocitos se diferencian a macrófagos efectoros y producen entre otros inmunomoduladores, el TNF- α que contribuye a la formación del granuloma, una estructura que sirve para contener al bacilo y la compartimentalización de la respuesta. Durante la formación del granuloma, se genera un microambiente con perfil pro-inflamatorio debido a la secreción de citocinas como, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17, y IL-23 y la presencia de quimiocinas como, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, y CXCL10. Mediante la formación del granuloma, se logra contener y estabilizar la infección primaria, la cual se define como Tb latente; se caracteriza por ciclos de activación y supresión celular que previenen la replicación y diseminación del bacilo. Sin embargo, si ocurre algún evento inmunosupresor que altere esta homeostasis, como la co-infección por el VIH, diabetes mellitus (DM), administración de fármacos inmunosupresores, o un estado de desnutrición, ocurre la reactivación del bacilo y se desarrolla Tb activa [41]. **Fig. 4.**

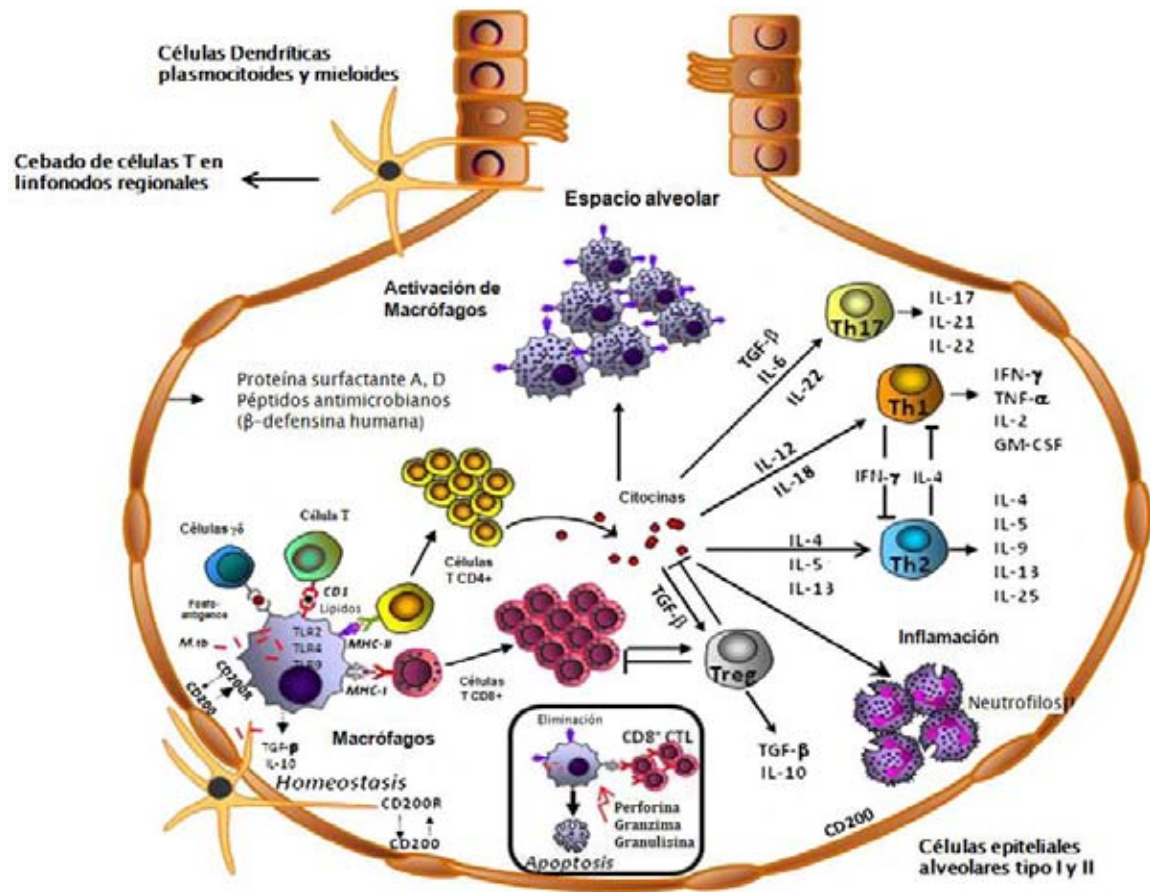


Fig. 4. Componentes de la inmunidad innata e inmunidad celular en los espacios bronquioalveolares en respuesta a la infección por micobacterias. (Tomado y modificado de Schwander, 2011)

2.9 Descripción de las principales poblaciones contra la infección por *M. tuberculosis*

2.9.1 Linfocitos T CD4 cooperadores

M. tuberculosis reside principalmente en el fagosoma dentro de macrófago, y la presentación de antígenos micobacterianos se realiza mediante el MHC-II hacia linfocitos T CD4 [40]. En humanos se ha observado que la co-infección con el VIH, y la pérdida de linfocitos T CD4, incrementa considerablemente la susceptibilidad de desarrollar Tb aguda o de reactivar a enfermedad si ya está infectado [42]. En sujetos VIH+/TST+ se ha observado que tienen un riesgo anual de desarrollar Tb en 8-10%, comparado con un 10% de desarrollar la enfermedad en sujetos VIH-/TST+ a lo largo de sus vidas [11].

El mecanismo efector principal de estas células es producir IFN- γ , el cual activa macrófagos que pueden controlar o eliminar el microorganismo intracelular. En un estudio donde se infectaron ratones con dosis bajas de *M. tuberculosis* y se

eliminaron los linfocitos T CD4, se observó que había una reactivación de la infección y morían con altas cargas bacterianas en pulmón [40].

Otra de las funciones de los linfocitos T CD4, es la activación y maduración de las CPA, por la interacción de CD40L presente en linfocitos con el CD40 presente en macrófagos o DC y se produce actividad co-estimuladora más eficiente. Sin embargo, hay estudios en donde se observó que macrófagos infectados por *M. tuberculosis* disminuyen su capacidad como CPA contribuyendo a la incapacidad del hospedero de eliminar la infección persistente [43]. Por último los linfocitos T CD4 pueden controlar la infección por mecanismos alternos como la apoptosis y lisis de células T CD4 infectadas, pero se ha observado tiene un pobre efecto antimicobacteriano [44].

Es indiscutible la importancia de los linfocitos T CD4 en la inmunidad contra Tb, confirmado por la secreción de un gran número de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-1 β , IL-12 y TNF- α), en respuesta a diversos antígenos micobacterianos en pacientes infectados con *M. tuberculosis*, por lo que de manera reciente se ha implementado el uso de estas moléculas como biomarcadores para distinguir entre Tb activa, Tb latente, individuos vacunados con BCG y de respuesta a tratamiento [45-48].

2.9.2 Linfocitos T CD8 citotóxicos

Los linfocitos T CD8 conocidos como linfocitos T citotóxicos, también forman parte de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. La contribución de estas células comienza por el reconocimiento de antígenos presentados por moléculas MHC tipo I, con mayor eficiencia para presentar antígenos citoplasmáticos [49]. En un estudio en ratones en los cuales se deletaron genes que codifican para la β 2 microglobulina, demostraron mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*, lo que sugiere que su participación no es del todo definitiva para conferir protección [50].

La presentación de antígenos a células T CD8 ocurre tanto por células infectadas como por DC que toman fragmentos apoptóticos de macrófagos infectados [51]. Estudios recientes demuestran que las células T CD8 se dirigen a pulmón con una cinética similar a la de los linfocitos T CD4. Su mecanismo de acción es secretar IFN- γ para activar macrófagos y así controlar la infección, pueden eliminar células infectadas o directamente al bacilo por la secreción de elementos citotóxicos como granzimas, perforinas y granzimas, observados en modelo murino y en TBb. Existe evidencia en modelos de ratón que sugiere que la función citotóxica se incrementa en la infección temprana y desciende conforme avanza la infección, en tanto que la producción de citocinas, permanece aún en estado latente [49]. Sin

embargo, se sabe que los linfocitos T CD8 no pueden compensar la deficiencia de la producción de IFN- γ por linfocitos T CD4 [40].

Los linfocitos T CD8 más que observarlos como marcadores, se deben asociar a la evolución de la infección en el tiempo y actualmente con el reconocimiento de antígenos lipídicos y glicolipídicos de *M. tuberculosis* presentados por moléculas CD1 [49, 52].

2.9.3 Células Th17

Otro subgrupo de células T, son las células Th17, su fenotipo está definido por la producción de citocinas como IL-17A e IL-17F, también IL-21 e IL-22, inductoras claves de la inflamación y la respuesta inmune protectora [53]. La polarización hacia Th1 o Th17 ocurre por la exposición a IL-12 para Th1 o TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23 para Th17 [54, 55]. El receptor de la IL-17 es expresado en diferentes órganos incluyendo pulmón, hígado y bazo, las células capaces de responder a IL-17 incluyen DC, macrófagos, queratinocitos y fibroblastos [56]. La IL-17 induce una respuesta que incluye la expresión de moléculas pro-inflamatorias como G-CSF, quimiocinas (CXC, IL-6 e IL-8), proteínas antimicrobianas y la granulopoyesis [53].

En distintos estudios se ha mostrado que la IL-17 estimula la producción de defensinas, reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de inflamación [57]. De las principales células productoras de IL-17 en pacientes con Tb, son las células T $\gamma\delta$. En modelos de infección con *M. bovis* BCG, se observó que la ausencia de IL-17 reduce la generación de células Th1 productoras de IFN- γ y además se observó daño en el reclutamiento de neutrófilos al pulmón, sin incremento de la carga bacteriana. La producción de IL-17 puede funcionar como un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa y contribuir a la protección contra patógenos intracelulares [58].

Las células Th17 son especialmente relevantes durante la fase temprana de la infección por *M. tuberculosis*, como se observó en modelos murinos [59]. En otro estudio en humanos se observó que un incremento de células T productoras de IL-17 está asociado con infección latente [60]. En otro estudio se observó que hubo mayor severidad de la enfermedad en los individuos con un número reducido de células T productoras de IL-17 [61]. Por otro lado en un estudio en donde se vacunaron niños y adultos con BCG, se observó que al estimular sus células con PPD mostraron una fuerte respuesta de células Th17. La IL-17A es esencial para la formación del granuloma pulmonar maduro en modelos de infección con BCG y *M. tuberculosis* [62], sin embargo, la hiperactividad de estas células ha mostrado ser perjudicial para los individuos lo que produce un incremento en la severidad de la infección por *M. tuberculosis*, acompañada por la excesiva entrada de

neutrófilos al granuloma y la inducción de destrucción de tejido, en lugar de contener la infección [63].

La IL-17 se ha observado que ofrece un papel protector a largo plazo ya que se encuentra con mayor frecuencia en individuos expuestos sanos que en pacientes con Tb pulmonar activa [48].

2.10 Antígenos micobacterianos ESAT-6 y CFP-10

Estudios genómicos han revelado que la RD-1 que codifica para las proteínas ESAT-6 y CFP-10 en el genoma del CMTB, está ausente en las cepas vacunales de BCG, y ciertas MNT [64].

La región RD-1 del CMTB consta de nueve genes de Rv3871 a Rv3879c; Rv3874 codifica para CFP-10 (*esxB*) y Rv3875 para ESAT-6 (*esxA*). Estas dos proteínas son de bajo peso molecular y con un alto potencial de inducir una respuesta inmune mediada por células [64, 65]. La función principal de RD-1 es facilitar la secreción de ESAT-6 y CFP-10 por el sistema ESX-1 [66]. El sistema de secreción juega distintos papeles en la patogénesis de la Tb, desde factor de virulencia, hasta inmunomodulador. Se ha observado, que participan en mecanismos de interacción hospedero-patógeno, e intervienen en la lisis celular, contribuyen en la formación del granuloma, suprimen la secreción de citocinas, inducen IFN de tipo I, el cual es dependiente de la secreción de ESX-1, lo que produce la multiplicación del bacilo; también intervienen en el arresto de la maduración fagosomal, en la translocación de bacterias al citosol por un mecanismo en el que ESAT-6 se disocia de CFP-10 a pH ácido y es capaz de interactuar con liposomas causando la lisis del mismo, entonces el bacilo escapa a la degradación fagolisosomal. Además, pueden disregular la producción de especies reactivas de oxígeno dentro de macrófagos, inhiben la expresión de genes dependientes del factor nuclear kappa B (NF- κ B) [67]. Por último, se ha observado que interaccionan con TLR en especial el TLR-2 [68]. De igual forma, la supresión de ESX-1 en *M. tuberculosis* produce la atenuación de la virulencia, mientras que la transferencia de ESX-1 en BCG restaura parcialmente la virulencia [69]. Por otra parte, contribuyen en la inmunomodulación, disminuyen la señalización celular de macrófagos, DC, y la función de células T [68].

Las proteínas ESAT-6 y CFP-10 han sido evaluadas como candidatas para vacunas y se utilizan como antígenos en métodos como IGRA y citometría de flujo para estimular y medir la respuesta de células T en sujetos con probable Tb. Se han utilizado en un gran número de ensayos como complemento de la prueba *in vivo* de TST, en IGRA y en ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [70]. *Van Pinxteren y cols.*, estudiaron el potencial diagnóstico de ESAT-6 y CFP-

10 en un modelo de infección animal, en infección natural de Tb en humanos y ganado. Sus resultados indican que ambos antígenos son reconocidos tanto *in vivo*, con capacidad de inducir hipersensibilidad retardada, e *in vitro* inducen la producción de IFN- γ por linfocitos. En humanos, la combinación de ambos antígenos tuvo una sensibilidad de 73% y especificidad mayor de 93% en comparación con el PPD con tan solo de 7% [71].

2.11 Derivado proteico purificado

El PPD es una mezcla cruda de antígenos micobacterianos, que contienen tanto antígenos secretados como proteínas somáticas, ha sido utilizada por más de medio siglo en el diagnóstico presuntivo de Tb y en estudios epidemiológicos. Contiene antígenos micobacterianos que se comparten entre micobacterias patógenas pertenecientes al CMTB, MNT, y la cepa vacunal de *M. bovis* BCG, por lo que su aplicación solo indica la exposición a micobacterias, sin capacidad de distinguir entre una respuesta vacunal, exposición a MNT o una verdadera infección por organismos del CMTB patógenas [18,21].

2.12 Evaluación de células T antígeno específico

La citometría de flujo es una tecnología que permite la medición simultánea de múltiples características físicas y químicas de células en suspensión, informa el tamaño, granularidad y la evaluación de características químicas con fluorocromos y anticuerpos conjugados, evalúa en promedio más de dos mil partículas por segundo [45].

Con la citometría de flujo ha sido posible evaluar la respuesta inmune contra Tb [72]. Existen estudios en donde se ha evaluado que este método tiene un mejor valor predictivo positivo que la prueba de TST para el diagnóstico de infección por *M. tuberculosis*. Por citometría de flujo se midió la respuesta de células T CD4+ posterior a la estimulación con PPD y ESAT-6 de individuos con Tb activa, Tb latente, sanos vacunados con BCG y sin vacunar. A todos los individuos se les aplicó la prueba TST. Se observó que al estímulo de PPD hubo respuesta discriminatoria entre los individuos con TB activa, Tb latente y vacunados comparados con los no vacunados, mientras que con ESAT-6 hubo discriminación entre sujetos con Tb activa e individuos vacunados [45]. Otros estudios han mostrado que, para distinguir entre Tb activa y Tb latente se basan en la producción de IFN- γ por linfocitos T CD4 en respuesta a antígenos como PPD, con una sensibilidad y especificidad de 100%, o bien la producción de citocinas como IL-2, IL-4, IL-10 y TNF- α por linfocitos T CD4 en respuesta a antígenos como ESAT-6 y/o CFP-10 con una sensibilidad que varía de 67-100% y una especificidad de 36.4-100% [73-76].

Por otro lado la citometría de flujo ha sido utilizada para monitorear la respuesta al tratamiento anti-tuberculosis. En un estudio con sujetos en tratamiento se llevó a cabo la comparación entre el ensayo IGRA y citometría de flujo en donde se determinó el porcentaje de células T CD4 polifuncionales productoras de IFN- γ y TNF- α . Se observó que se reduce el porcentaje de dichas células en pacientes después del tratamiento, mientras que no se observa diferencia en la concentración de IFN- γ medido por el ensayo IGRA [72].

3 ANTECEDENTES

Se ha visto que existen discrepancias entre los resultados de las pruebas TST e IGRA a pesar de ser pruebas equivalentes en algunas guías de uso. Este fenómeno, se explica parcialmente por la diferente prevalencia de la enfermedad entre las regiones, la edad de la población y el estado de vacunación con BCG así como por la sensibilización a micobacterias ambientales. Sin embargo, existe aún un porcentaje de estas discrepancias que no son explicadas por estos factores [77]. Los posibles panoramas indican que para la eliminación del bacilo por células del sistema inmune innato sin el priming de células T específicas de antígeno conlleva al resultado TST-/IGRA-, por otro lado, se puede controlar la infección con la asociación de células específicas de antígeno y bacilos en estado no replicante con resultado TST+/IGRA- y por último la persistencia de bacilos en estado replicante a nivel sub-clínico por el sistema inmune podría resultar en TST+/IGRA+. Se ha propuesto, mayor sensibilidad de las pruebas de TST para detectar infecciones resueltas o Tb latente “antigua”, mientras que el IGRA detecta Tb latente o infección reciente [78, 79].

Por otra parte, la proporción de individuos que se encuentran verdaderamente infectados con *M. tuberculosis* después de tener un resultado positivo por la prueba de TST o conversión del IGRA es desconocida, y aún no es posible del todo predecir de entre los sujetos infectados quiénes desarrollarán Tb, de igual forma se desconoce cuánto dura la respuesta inmune adaptativa hacia los antígenos micobacterianos persistentes en ausencia del bacilo vivo, lo que puede contribuir de igual forma a la discrepancias entre las pruebas diagnósticas. Por otra parte se sabe que existe una variabilidad *per se* entre individuos, lo que complica la interpretación de las pruebas [22].

En un estudio llevado a cabo en un área con alta prevalencia de Tb, que tuvo por objetivo analizar los factores asociados a discordancias entre las pruebas de TST e IGRA entre contactos de pacientes con Tb pulmonar activa, se observó un 76% de concordancia entre pruebas y 24% de discordancia; 72% tuvieron TST+/IGRA- y 28% TST-/IGRA+, en los grupos TST+/IGRA- y TST+/IGRA+ se encontraron cicatrices pulmonares viejas, mientras que en el grupo TST-/IGRA+ presentó periodos más prolongados de exposición a contactos con Tb activa. Por lo que concluyen que el resultado de la prueba de TST es más adecuado para tomar la decisión de dar tratamiento a individuos con infección latente, en áreas con alta prevalencia [80].

En otro estudio en un país con baja prevalencia de Tb, se analizaron posibles factores relacionados con las discordancias entre las pruebas de TST e IGRA. La discordancia entre pruebas fue de 15.4%, de las cuales 78% tenía TST+/IGRA- y

22% fueron TST-/IGRA+, la regresión logística mostró que la vacunación con BCG y la migración de los individuos explicaron el 85.1% de los resultados de TST+/IGRA-, mientras que la edad estuvo relacionada en un 49.1% de la discordancia entre pruebas TST-/IGRA+ [81].

Nuestro grupo llevó a cabo un estudio en el CAIT, para determinar la dinámica de la transmisión de la TBb a humanos en personal de alto riesgo. Se realizaron TST e IGRA, en 311 trabajadores del CAIT, 76.2% fueron diagnosticados como infección latente por TST y 58.5% por IGRA. La exposición ocupacional estuvo asociada con un OR de 2.72 para TST y de 2.38 para IGRA. Solo se encontraron dos casos con Tb pulmonar por *M. bovis* [38].

Además incluimos 65 niños menores de 5 años residentes de 28 establos participantes en el estudio; se les realizó exploración física, y se les realizó TST e IGRA; encontramos que el 38% de los niños presentaron al menos una prueba positiva, 8 TST+/IGRA+, 6 TST-/IGRA+, 11 TST+/IGRA- y 40 con ambas pruebas negativas. En cuatro niños con TST+/IGRA+ se observaron datos compatibles con Tb abdominal demostrada por ultrasonografía abdominal. Diecisiete niños asintomáticos con TST+ y/o IGRA+ fueron considerados con infección latente por *M. tuberculosis* (datos no publicados).

En base a los resultados obtenidos en este estudio piloto lo que se pretende en este trabajo es determinar si existe diferencia en los subtipos celulares entre los grupos discrepantes y concordantes de TST e IGRA, mediante la medición de citocinas por exposición a los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10.

4 JUSTIFICACIÓN

Se desconoce el impacto real de la exposición ocupacional o ambiental a *M. bovis*, así como el efecto de la re-estimulación constante con un microorganismo menos adaptado al humano pero probablemente más inmunogénico. Por ello, es importante conocer cuál es el impacto inmunológico de la exposición a la fuente primaria de *M. bovis*. Por este motivo, es importante medir las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th17, y perfil de citocinas IFN- γ e IL-17) de individuos expuestos ocupacionalmente al medio ambiente con alta carga de *M. bovis*. Lo anterior podría plantear una nueva línea de investigación en el desarrollo de vacunas o bien replantear estrategias como la revacunación.

5 HIPÓTESIS

La población expuesta de manera crónica a ganado infectado por *M. bovis* sin evidencia de infección y con resultados diversos de TST e IGRA presentan diferencias en las subpoblaciones celulares.

6 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe diferencia entre la población expuesta de manera crónica a ganado infectado por *M. bovis* en los grupos TST+/TST-, IGRA+/IGRA- en base a la producción de IFN- γ e IL-17A?

7 OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil inmunológico de una población de trabajadores TST+/TST- e IGRA+/IGRA- expuestos a ganado infectado por *M. bovis*.

8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la proporción y fenotipo de células productoras de IFN- γ en respuesta a la estimulación *in vitro* con antígenos ESAT-6, CFP10 y PPD en los grupos de estudio.
- 2) Determinar la proporción y fenotipo de células productoras de IL-17A en respuesta a la estimulación *in vitro* con antígenos ESAT-6, CFP10 y PPD en los grupos de estudio.

9 MÉTODO

9.1 Diseño del estudio

Transversal y comparativo

9.2 Población de estudio

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la cohorte de trabajadores del CAIT expuestos a ganado bovino infectado por *M. bovis*, con resultado de TST e IGRA disponibles.

9.3 Criterios de selección de los individuos:

- ✓ Sexo: Masculino
- ✓ Edad: >15 <65 años
- ✓ Estar vacunado con BCG
- ✓ Tiempo mínimo de trabajar en el establo: Más de un año
- ✓ Tiempo en contacto con el ganado: Más de 6 horas diarias
- ✓ Actividad: Ordeñadores, matanceros y encargados

9.4 Criterios de exclusión

- ✓ Sexo: Femenino
- ✓ Edad: <15 años
- ✓ Menos de un año de trabajar en un establo
- ✓ Menos de 6 horas diarias de contactos con ganado
- ✓ No vacunados con BCG
- ✓ Que no se conozca el estatus de TST e IGRA

9.5 Grupos a estudiar de esta población:

- Individuos con TST+ (>15mm) / IGRA +
- Individuos con TST+ (>15mm) / IGRA -
- Individuos con TST- (<5mm) / IGRA +
- Individuos con TST- (<5mm) / IGRA -

10 METODOLOGÍA

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (REF. 2051), financiado por el proyecto CONACyT FOMIX-HGO-2008-C01-96469. Se obtuvo el consentimiento informado de cada individuo antes de tomar la muestra de sangre.

10.1 Obtención de resultados de las pruebas de TST e IGRA

Se realizaron las pruebas de TST e IGRA, los criterios de positividad para cada prueba fue de >15mm para la prueba de TST y un valor >6 spots para la prueba de IGRA, en respuesta a los antígenos de ESAT-6 y CFP-10 evaluado por la técnica de ELISPOT [38].

10.2 Separación y congelación de PBMC

Se obtuvieron 20 mL de sangre periférica heparinizada de una cohorte de individuos expuestos a ganado bovino infectado por *M. bovis* en el año 2010, se separaron las PBMC de sangre periférica por centrifugación con Ficoll-Hypaque® (Cambrex, Walkersville, MD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se almacenó el banco de PBMC a -70°C, para su posterior análisis.

10.3 Descongelación de PBMC y evaluación de viabilidad por azul de tripán

Las PBMC se descongelaron de la siguiente forma: se prepararon alícuotas de 14 mL de medio Roswell Park Memorial Institute suplementado con 10% de suero fetal bovino (RPMI), se colocaron por 15 min en baño maría a 37°C, para posteriormente descongelar las PBMC hasta observar que el botón se despegara con facilidad, se adicionó 1 mL de medio a la muestra, se mezcló tres veces hasta que el botón se descongeló por completo y se transfirió al vial del 14 mL, se mezcló por inversión dos veces, se centrifugó a 1,000 rpm a 25°C por 10 min, se desechó el sobrenadante y se quitó el exceso de medio con micropipeta. Se re-suspendió el botón por agitación manual y se le agregó 1 mL de medio RPMI para realizar el ensayo de viabilidad celular por exclusión de azul de tripano. Se colocaron partes iguales de azul de tripano y de PBMC en papel parafilm, se mezclaron y se cuantificaron 10 µL de cada muestra en una cámara de Neubauer.

10.4 Expansión de células T antígeno específico

Debido a la baja frecuencia de células T antígeno específicas en sangre, se adicionó anticuerpo anti-CD-28 como agente co-estimulador para amplificar la

señal de una célula específica de antígeno y mantener la viabilidad celular [82]. En placas de 48 pozos (Corning Inc, NY, USA) se cultivaron 1×10^6 PBMCs en medio RPMI 1640 (Cambrex) y se cultivaron en presencia de: medio (control negativo), ESAT-6 (2.5 µg/mL) CFP-10 (2.5 µg/mL, Lionex GmbH, Braunschweig, Alemania), PPD (2.5 µg/mL) de (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca) y se adicionó 1 µg/mL de anti-CD28 (eBioscience, San Diego, CA, USA). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 7 días. Al séptimo día las células se re-estimularon con los mismos antígenos y al pozo marcado como control positivo se le agregaron 25 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) más ionomicina 1 µg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA). A cada una de las condiciones se les adicionó Brefeldina A (10 µg/mL) para inhibir el transporte y secreción de proteínas al medio, las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante otras 6 horas.

10.5 Evaluación de la viabilidad celular

Al término de la incubación, las células de cada condición fueron transferidas a tubos de poliestireno (Cat. No. 353078). Se eliminó el medio de cultivo adicionando 2 mL de PBS (Cambrex) en frío a cada tubo, las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm a 4°C por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1mL de PBS. Posteriormente, para determinar la viabilidad celular, se agregó a cada tubo la sonda Fixable Viability Dye eFluor 660 (eBioscience) a una dilución 1:10,000, se incubaron por 15 min en la oscuridad, y el exceso de sonda se eliminó adicionando 2 mL de PBS, los tubos se centrifugaron a 1,500rpm a 4°C por 5 min, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el volumen de PBS que quedó en el tubo y se procedió con la tinción celular.

10.6 Identificación de linfocitos Th1, Th17 y Treg.

La caracterización de células T se realizó utilizando anticuerpos monoclonales previamente titulados 1µL de anti-CD3 humano acoplado a PE-TexasRed (Life Technologies, Camarillo, CA, USA), 1µL de anti-CD8 humano acoplado a PE/Cy7, 1µL de anti-CD4 humano acoplado a PerCP/Cy5.5, y 2 µL de anti-CD25 humano acoplado a PE (BioLegend, San Diego, CA, USA), se incubaron a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 15 min. Para eliminar el exceso de anticuerpo se adicionó 1 mL de solución de lavado FACS (PBS, 2% SFB, 0.1% de azida de sodio), las muestras se centrifugaron a 1,500rpm a 4°C por 5 min, se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de solución permeabilizadora (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugaron a 1,500rpm a 4°C por 5 min, y se desechó el sobrenadante y

las células fueron resuspendidas por agitación. Para definir las poblaciones, se evaluó la producción de IL-17A intracelular, IFN- γ y FoxP3, adicionando anticuerpos monoclonales previamente titulados (Gráfica X) 10 μ L de anti-IFN- γ humano acoplado a APC/Cy7, 1 μ L de anti-IL-17A humano acoplado a Alexa Fluor 700, 1 μ L de anti-Foxp3 humano acoplado a Alexa Fluor 488 (BioLegend), se incubaron a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 min. Para eliminar el exceso de anticuerpo se agregó 1 mL de solución FACS, las muestras se centrifugaron a 1,500rpm a 4°C por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 200 μ L de solución FACS. Se adquirieron 400,000 eventos de cada muestra en un citómetro de flujo FACS CANTO II (BD Bioscience). Los resultados se expresan en porcentaje de células. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo v10 (Tree Star; Ashland, OR, USA).

10.7 Estrategia de análisis para la evaluación de células Th1, Th17 y Treg

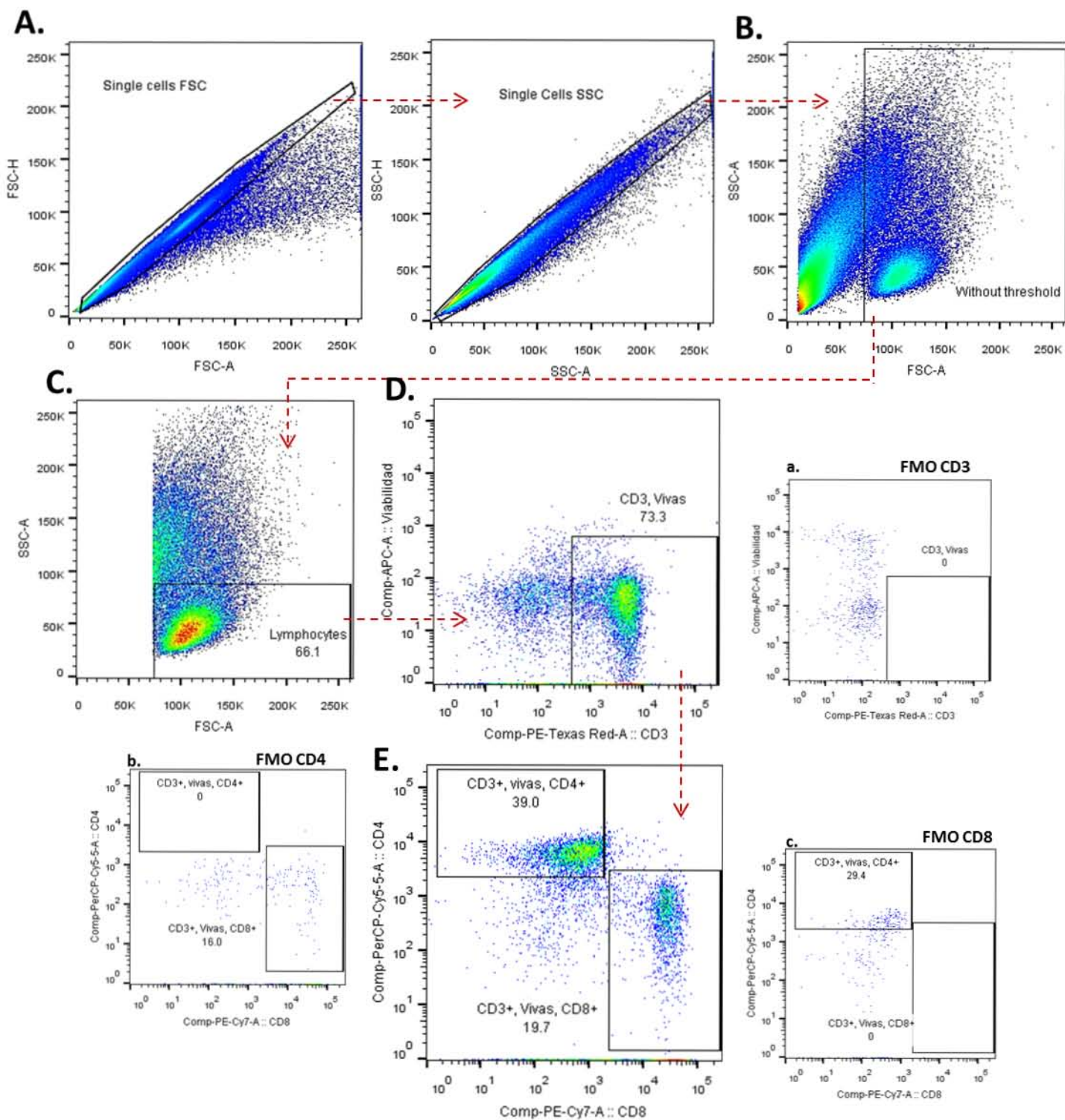
Se inició la selección de células individuales por tamaño celular (FSC-A Vs. FSC-H) seguido de la complejidad interna (SSC-A Vs. SSC-H), se eliminaron células dobles, se asumió que A (área) es directamente proporcional a H (altura), por lo tanto la célula tendrá el mismo valor o similar en ambos ejes, y se presenta con una dispersión diagonal que las células dobles **Fig. 5A**. Posteriormente, se excluyeron los detritos celulares **Fig. 5B** y, se seleccionó la población de linfocitos tomando la población más pequeña y menos compleja **Fig. 5C**. Luego se determinó la viabilidad de las células CD3, con la sonda marcada con fluorescencia, la cual se une a aminas celulares, penetra a través de las membranas celulares comprometidas y reacciona con las aminas libres, tanto en el interior como en la superficie celular, lo que resulta en un desplazamiento de 50 veces la señal fluorescente entre las células vivas y las muertas siendo las muertas más intensas, por lo cual se realizó la selección de células con menos fluorescencia y que expresaran el marcador CD3 en su superficie **Fig. 5D**.

En esta ventana de células, posteriormente se seleccionaron las sub-poblaciones de linfocitos CD3+ que expresan la molécula CD4 o CD8 en su superficie **Fig 5E**, para definir las poblaciones Th1 como células CD4 productoras de IFN- γ **Fig. 5F**, Th17, células CD4 productoras de IL-17A **Fig. 5G**, Tc1, células CD8 productoras de IFN- γ **Fig. 5I**, Tc17, células CD8 productoras de IL-17A **Fig. 5J** y células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) **Fig. 5H**. El punto de corte se estableció en base a la estrategia Fluorescence Minus One (FMO).

La proporción porcentual de las poblaciones fue provista por el programa en una tabla con estadística descriptiva por cada muestra.

10.8 Análisis estadístico

Para comparar dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Para la comparación entre los cuatro grupos se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism v5.0 (La Jolla, CA, USA). Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.



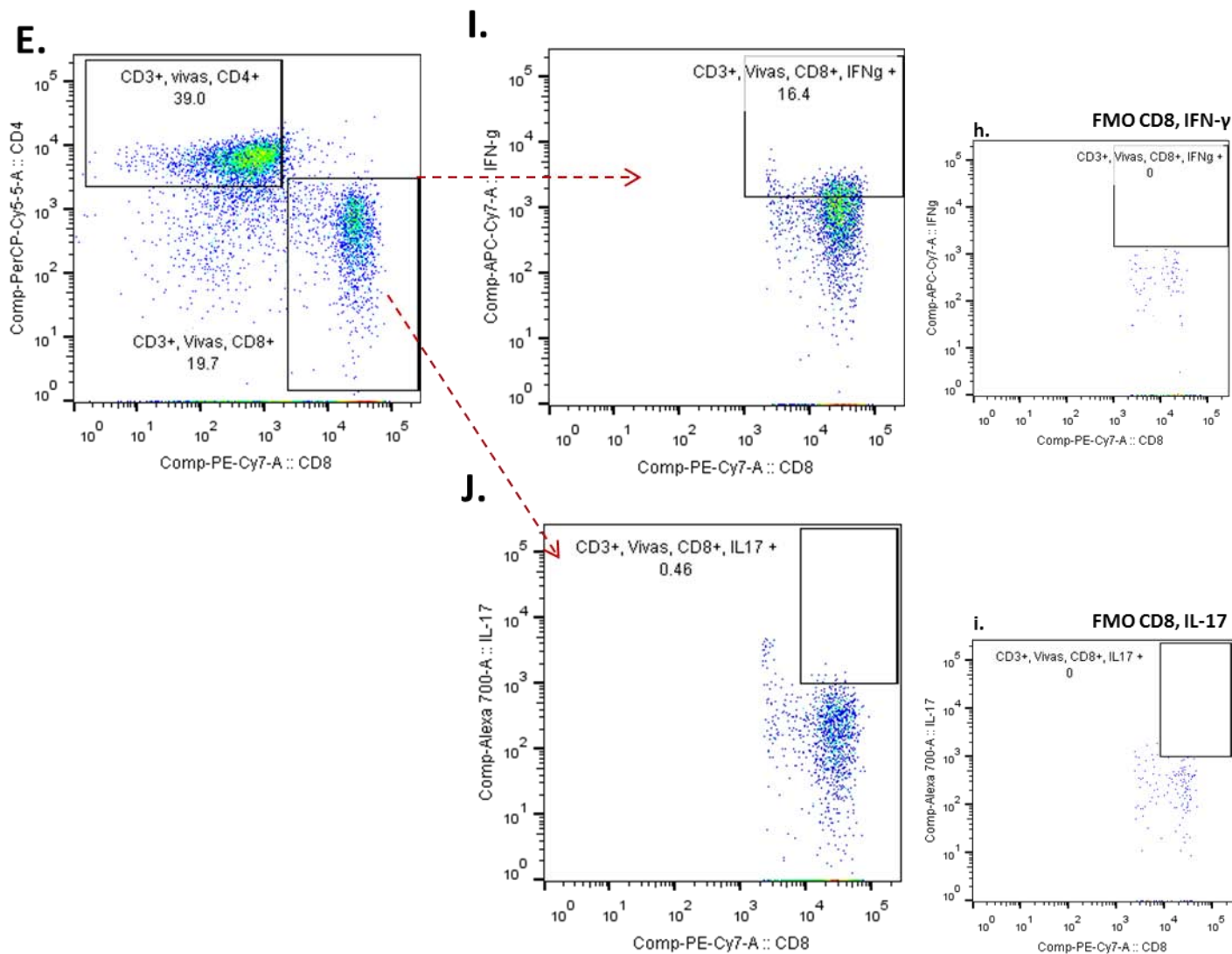


Fig. 5. Estrategia de análisis para la selección de poblaciones de células T CD4, CD8, productoras de citocinas y células Treg. Las PBMC se cultivaron en presencia de los estímulos específicos durante 7 días y se analizaron por citometría de flujo. Selección de células individuales (singles cells) **(A)**, eliminación de debris **(B)**, Selección de la población de linfocitos por tamaño y granularidad **(C)**, Selección de la población CD3+ y negativa para la sonda de viabilidad eFluor 660® **(D)**, Selección de las sub-poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ **(E)**. Selección de las poblaciones CD4 productoras de IFN- γ **(F)**, IL-17 **(G)** perfil de Treg CD4+CD25+FoxP3+ **(H)**, Población CD8+ productoras de IFN- γ **(I)**, IL-17 **(J)**. Se indica la FMO para cada uno de los marcadores **a-i.**, n=24. Gráficas representativas de un individuo de la población de estudio.

11 RESULTADOS

Población de estudio. Se seleccionaron para el análisis las muestras de 24 individuos que cumplieron los criterios de inclusión. Las características generales de los individuos incluidos en el estudio se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Características sociodemográficas y clínicas del grupo de individuos seleccionados.

N=24	n/N (%) Mediana (RIC)
Edad	32 (27-37.5)
Lugar de nacimiento	20 (83.3) Ver. 2 (8.3) Pue. 1 (4.1) Oax. 1 (4.1) Hgo.
Horas en contacto con los animales	8 (7-9.5)
Hallazgos Rx pulmonar	1 (4.35)
Tiempo viviendo en el CAIT	132 (90-192)
Tiempo en el trabajo actual	60 (32-108)
Contactos con tosedores	4 (16.6)
Consumo de alcohol	23/24 (95.8)
Consumo leche	9/24(37.5)
Glucosa	82 (66-86)
Hemoglobina glucosilada	< 6.5

*se muestra la mediana y el rango intercuartilar (RIC).

Los 24 individuos expuestos a ganado infectado por *M. bovis* fueron clasificados con respecto al resultado de sus pruebas de TST e IGRA, donde el 66.6% (18/24) dieron un resultado positivo para la prueba de IGRA, el (75%) 16/24 fueron positivos para la prueba de TST, 13/24 (54.1%) coincidieron con resultados TST+/IGRA+, 3/24 (12.5%) con resultado TST-/IGRA- y con 8/24 (33.3%) tuvieron resultados discordantes entre sus pruebas, los resultados se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Distribución de los individuos de acuerdo con los resultados obtenidos por las pruebas TST e IGRA.

	TST+	TST-	Total n/N (%)
IGRA+	13 (54.1)	3 (12.5)	16 (66.6)
IGRA-	5 (20.8)	3 (12.5)	8 (33.3)
Total	18 (75)	6 (25)	24 (100)

Viabilidad de las PBMC. Para conocer la viabilidad celular de las PBMC de las 24 muestras, se descongelaron y se analizaron con el colorante de exclusión azul de tripano, la viabilidad celular fue de $93.2\% \pm 4.0$ **Fig. 6**.

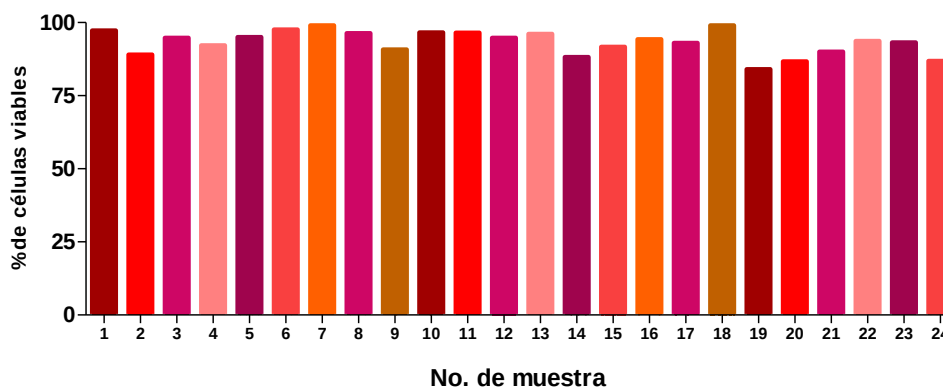


Fig. 6. Análisis de la viabilidad de las PBMC por exclusión con azul de tripano. Los resultados se presentan en porcentajes de viabilidad de las PBMC después de descongelar.

Estandarización de la concentración de antígenos. Para determinar la concentración de los antígenos utilizados como estímulo se evaluaron dos variables, el efecto citotóxico y la capacidad activadora de los mismos. Para realizar estos experimentos se utilizaron PBMC de tres individuos. Se evaluaron las siguientes concentraciones: 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de CFP-10 y ESAT-6; 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de PPD y 1 $\mu\text{g/mL}$ de anti-CD28 se adiciono en todas las condiciones. Se determinó la viabilidad de células CD3 después de 7 días de incubación y el porcentaje de activación celular por citometría de flujo.

Como se muestra en la **Fig. 7A**, no se observó diferencia en el porcentaje de viabilidad de células CD3 a las diferentes concentraciones probadas. Igualmente, no se observó diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células con expresión de CD25 entre las distintas concentraciones de antígenos específicos de *M. tuberculosis*, **Fig. 7B**. En base a estos resultados, se estableció la concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de ESAT-6 y CFP-10 para los siguientes análisis.

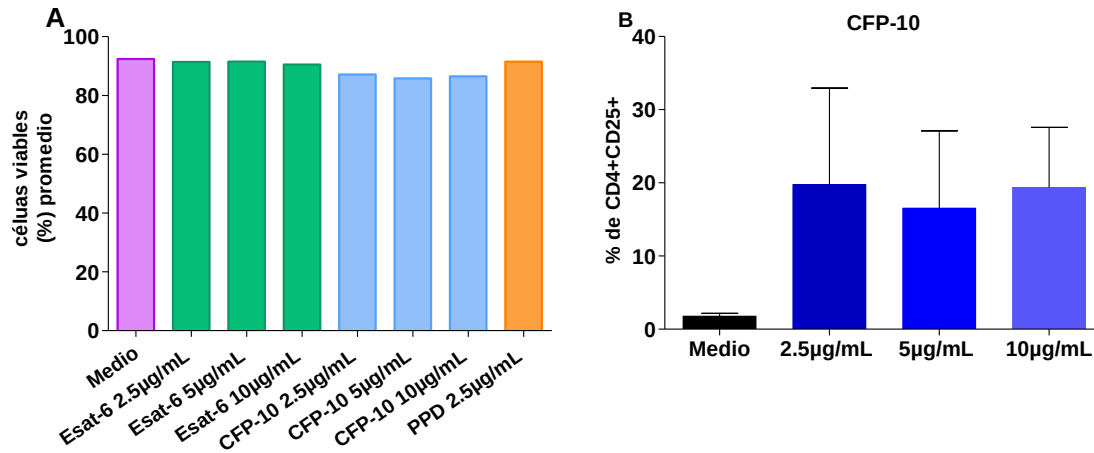


Fig. 7. Determinación de la concentración de antígenos. PBMC estimuladas con 2.5, 5 y 10 µg/mL de CFP-10+anti-CD28, ESAT-6+anti-CD28, 2.5 µg/mL de PPD+anti-CD28 y medio+anti-CD28 con incubación durante 7 días, se observa **A)** la viabilidad de células CD3 y **B)** la activación celular por citometría de flujo, se muestra solo una gráfica representativa, n=3.

Titulación de anticuerpos. Los anticuerpos anti- CD3, CD4, CD8, IL-17A, IFN- γ y FoxP3 se titularon previo al análisis celular. La titulación se realizó mediante la variación de volúmenes de los anticuerpos comerciales. **NOTA:** Los anticuerpos comerciales carecían de la especificación de concentración, por esta razón la titulación se presenta por volumen. **Fig. 8A** y **Fig. 8B** muestran del porcentaje de células positivas para cada uno de los anticuerpos, el criterio de positividad se estableció en base al valor de FMO. Por los resultados obtenidos se estableció que para CD3, CD4 y CD8, IL-17A y FoxP3 el volumen de 1µL, para CD25 fue 2µL y para IFN- γ de 10µL.

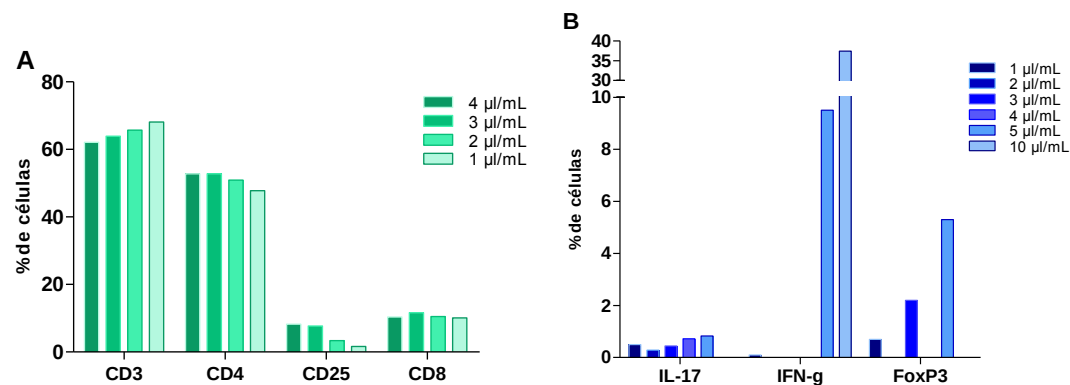


Fig. 8. Curvas de titulación de Ac. Cultivos de 1×10^6 PBMC se estimularon con PMA + Ionomicina por 6 h y se realizó la tinción con volúmenes diferentes (1, 2, 3 y 4µL) de **A)** Ac de superficie y **B)** Ac intracelulares, las células se analizaron por citometría de flujo.

Viabilidad de células T. Después de la expansión de células T antígeno específicas, se determinó por citometría de flujo, la viabilidad de las células CD3+ estimuladas durante 7 días. Se observó un promedio de 71% de células T viables (población CD3+), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los distintos estímulos como se muestra en la **Fig. 9**.

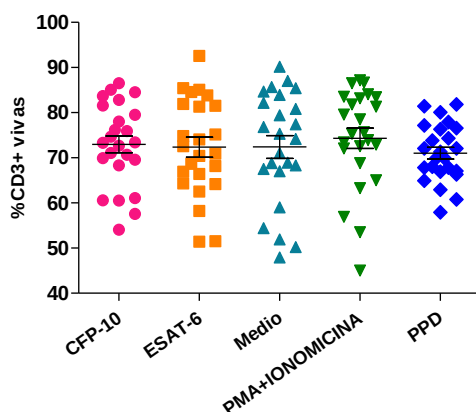


Fig. 9. Viabilidad de células CD3+ antígeno específico. Distribución de la viabilidad de células CD3+, después de 7 días de cultivo con CFP-10+anti-CD28, ESAT-6+anti-CD28, medio+anti-CD28, anti-CD28+PMA+Isonomicina y PPD+anti-CD28 utilizando eFluor660® por medio de citometría, n=24.

Identificación de poblaciones de linfocitos T. Los linfocitos T fueron identificados con anticuerpos específicos para determinar la población CD4 cooperadores y CD8 citotóxicos. Se observó que el porcentaje promedio de células positivas para los marcadores CD4 y CD8, fue de 47% y 24% respectivamente guardando la proporción 2:1, no se observó diferencia significativa entre los distintos estímulos probados **Fig. 10**.

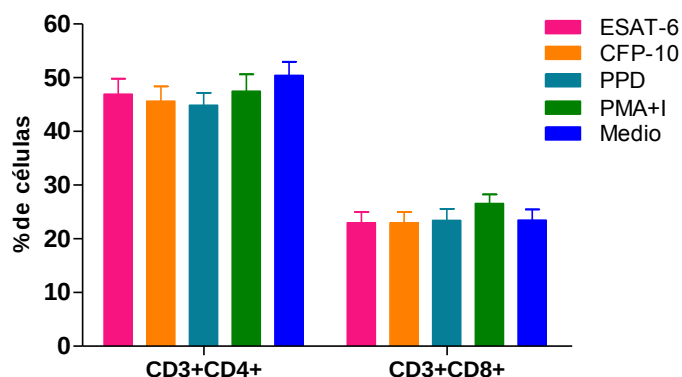
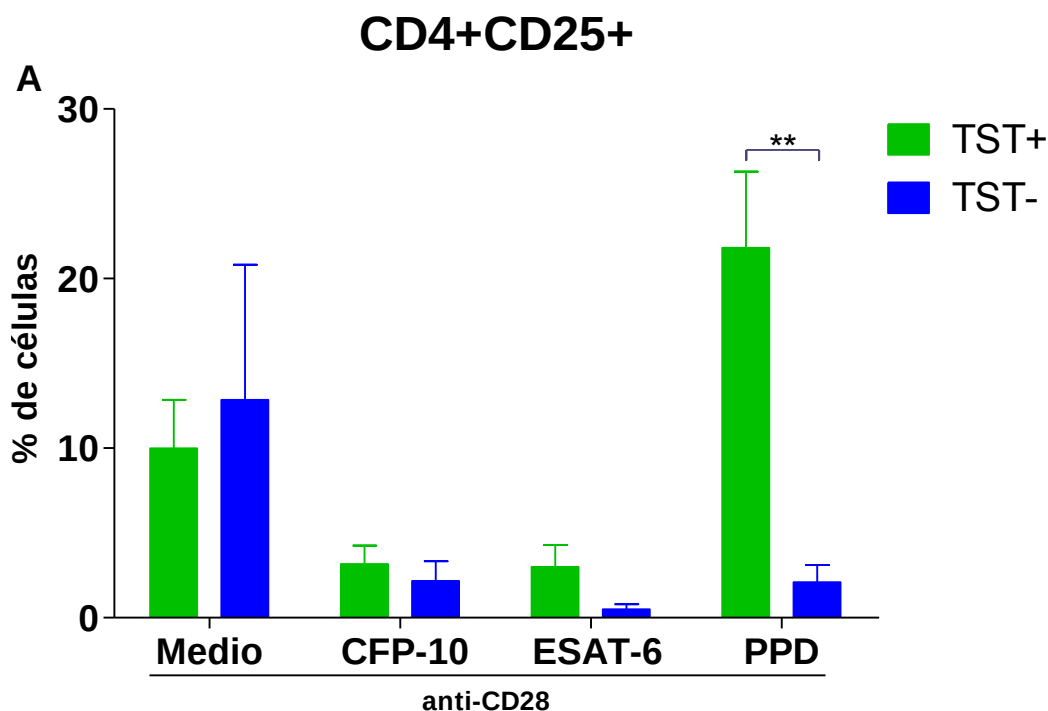


Fig. 10. Determinación de células T CD4 y CD8. Porcentaje de células CD4 y CD8 después del estímulo con ESAT-6+anti-CD28, CFP-10+anti-CD28, PPD+anti-CD28, anti-CD28+PMA+Isonomicina y medio+anti-CD28 durante 7 días de incubación, n=24.

Identificación de sub-poblaciones de linfocitos T.

En los individuos TST+ se observó mayor frecuencia de células CD4+CD25+ en comparación con los TST- en respuesta al estímulo con PPD, con diferencia estadísticamente significativa ($p=0.006$). Sin embargo, la frecuencia de células CD4+CD25+ fue similar en ambos grupos de estudio cuando las células se estimularon con los antígenos CFP-10, ESAT-6 y el medio. Es importante mencionar que la condición del medio está mostrando la frecuencia de células CD4+CD25+ en presencia de anti-CD28 (co-estimulación), molécula que se utilizó para incrementar la respuesta a antígenos específicos y que tanto ESAT-6 como CFP-10 disminuyen la frecuencia de células CD4+CD25+ en comparación con medio (anti-CD28). **Fig.11A.**

En los individuos IGRA+ se observó mayor frecuencia de células CD4+CD25+ en comparación con los IGRA- en respuesta al estímulo con PPD, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.530$). Por otra parte, la frecuencia de células CD4+CD25+ fue similar en ambos grupos de estudio cuando las células se estimularon con ESAT-6, CFP-10 y el medio (anti-CD28). Es importante mencionar que tanto ESAT-6 como CFP-10 también disminuyen la frecuencia de células CD4+CD25+ en comparación con el medio (anti-CD28). **Fig. 11B.**



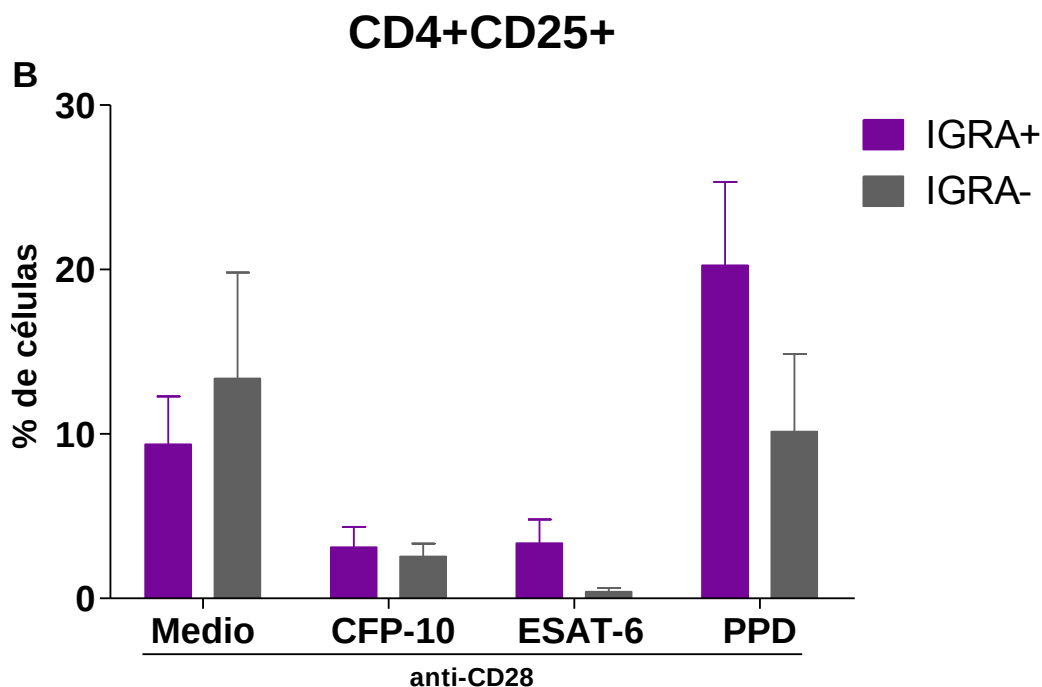


Fig. 11. Determinación de la proporción de células CD4+CD25+. Resultados del análisis de PBMC de los individuos seleccionados en respuesta al estímulo con Medio+anti-CD28, CFP-10, ESAT-6 y PPD, durante 7 días y analizadas por citometría de flujo, se realizó comparación entre grupos de **A)** TST+/TST-; **B)** IGRA+/IGRA-, con la prueba U de Mann-Withney, un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Por otra parte, cuando se analizó la frecuencia de células T CD4 productores de IFN- γ en respuesta a los antígenos y la co-estimulación con anti-CD28. Se observó una mayor proporción de células T CD4 productores de IFN- γ cuando las células fueron cultivadas en ausencia de antígeno (co-estimulación con anti-CD28) en los individuos TST+ en comparación con los TST-, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Asimismo, la frecuencia de células T CD4 productores de IFN- γ fue mayor en individuos con TST+ en respuesta a PPD aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa en comparación con los TST-. En contraste, la frecuencia de células T CD4 productores de IFN- γ en respuesta a CFP-10 y ESAT-6 fue significativamente mayor en los TST+ ($p=0.032$, $p=0.006$) en comparación con los TST-. **Fig. 12A.**

Posteriormente, se evaluó la frecuencia de células T CD4 productoras de IFN- γ en individuos IGRA+ e IGRA-, se observó que en presencia de anti-CD28 y CFP-10 la frecuencia fue mayor en individuos IGRA+ aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación con los IGRA-. Por otra parte, se observó mayor frecuencia de células T CD4 productoras IFN- γ en los individuos IGRA+ en respuesta a ESAT-6 y PPD con diferencia estadísticamente significativa ($p=0.046$, $p=0.018$) respectivamente, en comparación con los IGRA-. **Fig. 12B.**

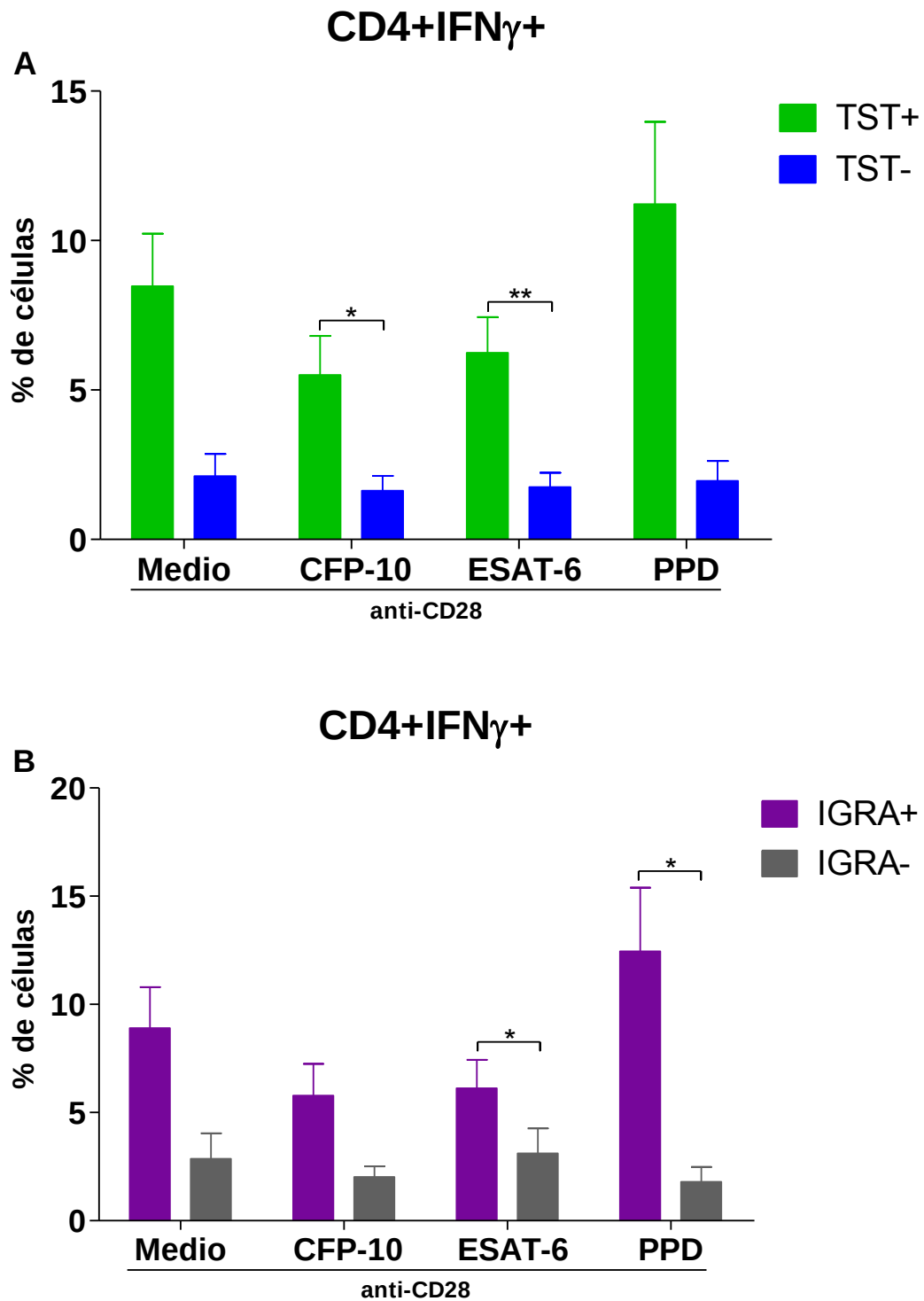
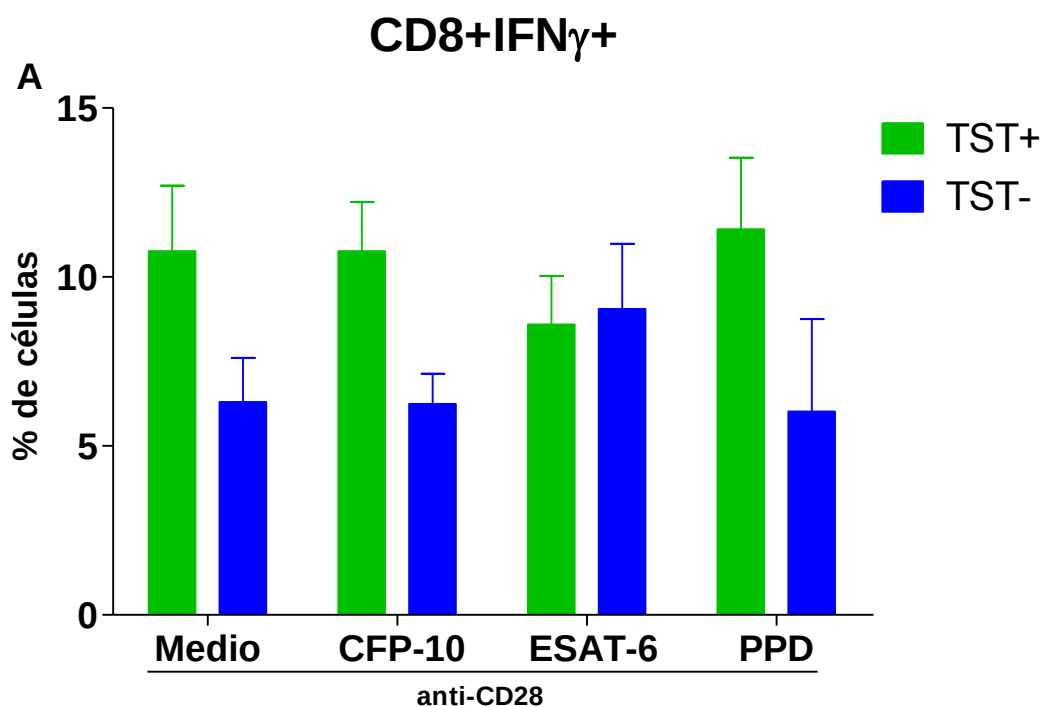


Fig. 12. Determinación de la proporción de células CD4+IFN γ +. Resultados del análisis de PBMC de los individuos seleccionados en respuesta al estímulo con Medio+anti-CD28, CFP-10, ESAT-6 y PPD, durante 7 días y analizadas por citometría de flujo, se realizó comparación entre grupos de **A)** TST+/TST-; **B)** IGRA+/IGRA-, con la prueba U de Mann-Withney, un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Al estudiar la respuesta de células T CD8 productoras de IFN- γ , se observó mayor frecuencia de estas células en individuos con TST+, en respuesta al medio + anti-CD28, CFP-10 y PPD, pero sin mostrar diferencia estadísticamente significativa en comparación con los individuos TST-. Con respecto a la respuesta a ESAT-6, la frecuencia de células T CD8 productoras de IFN- γ fue similar en individuos con TST+ y TST-. **Fig. 13A.**

Por otra parte, la frecuencia de células T CD8 productoras de IFN- γ fue similar en los grupos de IGRA+ e IGRA- cuando las células se estimularon con anti-CD28 en ausencia de antígeno. Asimismo, en los individuos IGRA+, se observó una frecuencia similar de células T CD8 productoras de IFN- γ en comparación con los IGRA- en respuesta a CFP-10 y PPD. Por último, la frecuencia de células T CD8 productoras de IFN- γ aunque se muestra un ligero aumento en los individuos con IGRA- en comparación con los IGRA+ al estímulo con ESAT-6, esta no fue significativa entre los grupos. **Fig. 13B.**



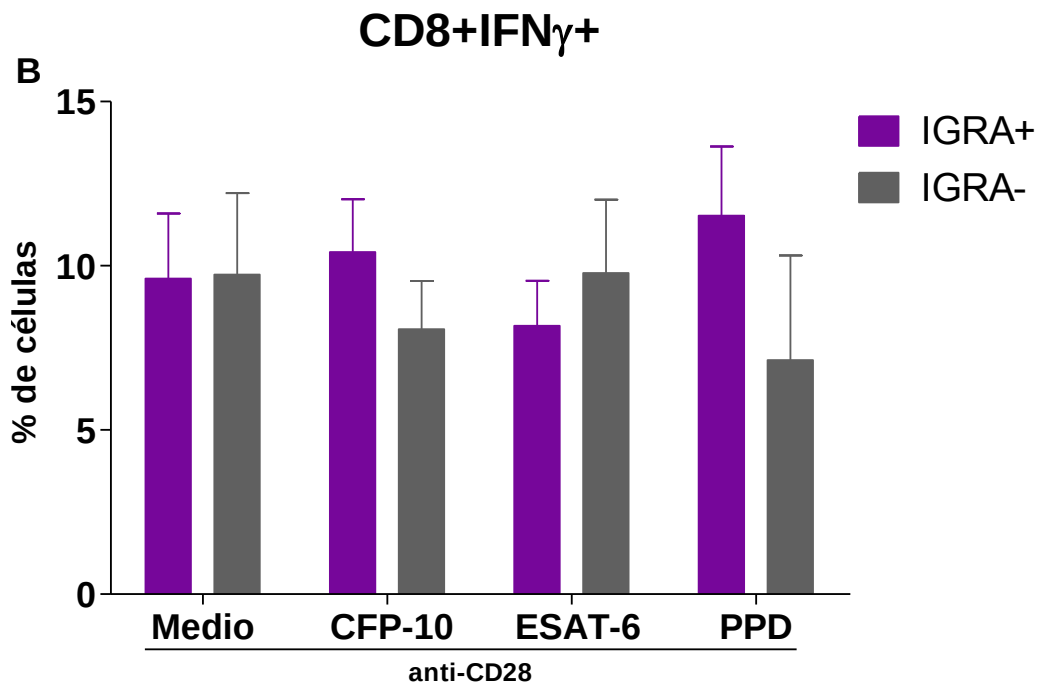


Fig. 13. Determinación de la proporción de células CD8+IFN- γ +. Resultados del análisis de PBMC de los individuos seleccionados en respuesta al estímulo con Medio+anti-CD28, CFP-10, ESAT-6 y PPD, durante 7 días y analizadas por citometría de flujo, se realizó comparación entre grupos de **A)** TST+/TST-; **B)** IGRA+/IGRA-, con la prueba U de Mann-Withney, un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Con respecto a las células CD4 productoras de IL-17A, se observó mayor frecuencia en los individuos con TST+ en comparación con los TST- en respuesta al medio+anti-CD28 (co-estimulación) y al PPD, sin embargo, no se observó diferencia significativa entre grupos. Además, hubo mayor frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17A en respuesta a CFP-10 en individuos TST- en comparación con los TST+, sin diferencia significativa entre los grupos, en tanto que la respuesta a ESAT-6 fue similar en ambos grupos TST+/TST-. **Fig. 14A.**

Posteriormente, en los individuos con IGRA+ se observó mayor frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17A al estímulo con PPD y medio+anti-CD28 en comparación con los TST-, sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre grupos. No obstante, el estímulo con CFP-10 y ESAT-6 mostraron mayor frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17A en individuos IGRA+ en comparación con los individuos IGRA-, con diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.005$, $p = 0.010$) respectivamente **Fig. 14B.**

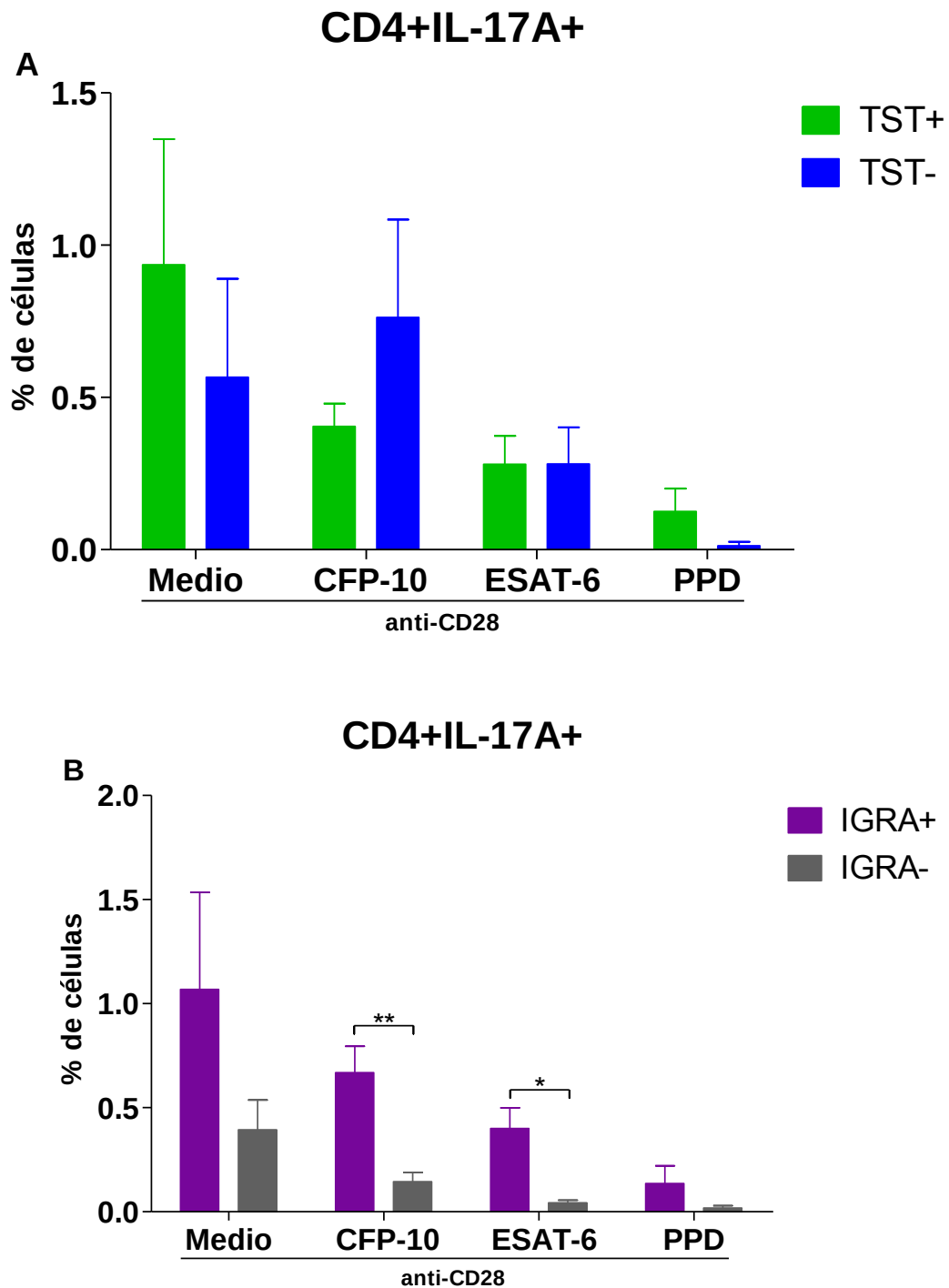
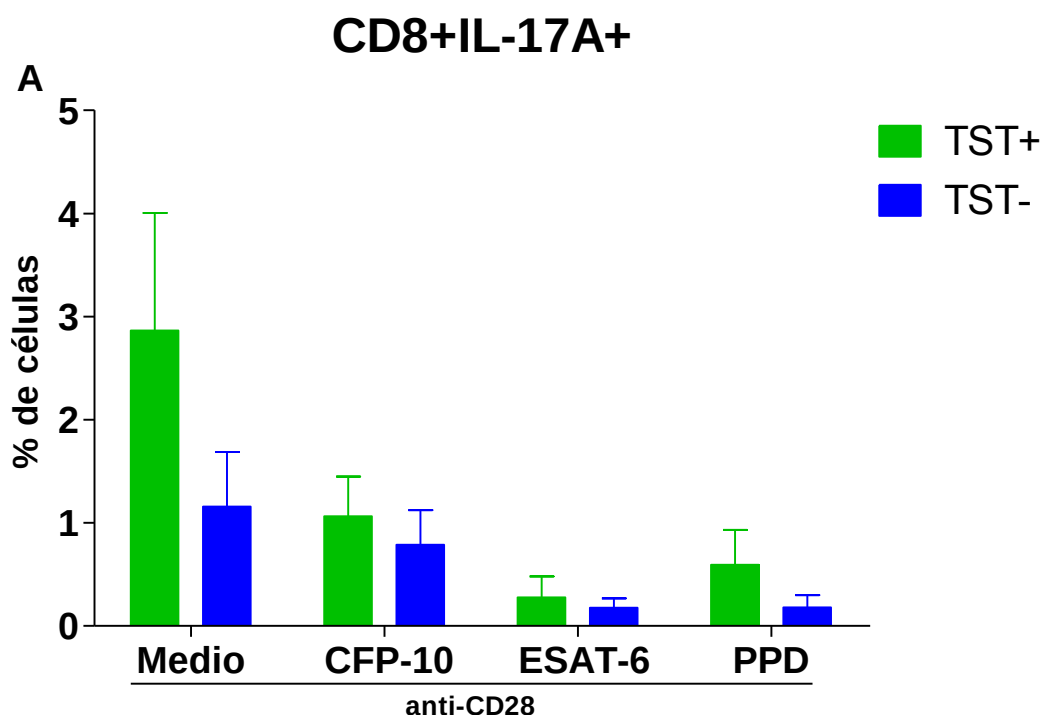


Fig. 14. Determinación de la proporción de células CD4+IL-17A+. Resultados del análisis de PBMC de los individuos seleccionados en respuesta al estímulo con Medio+anti-CD28, CFP-10, ESAT-6 y PPD, durante 7 días y analizadas por citometría de flujo, se realizó comparación entre grupos de **A)** TST+/TST-; **B)** IGRA+/IGRA-, con la prueba U de Mann-Whitney, un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

En el análisis de la población de células T CD8 productoras de IL-17A, se observó ligeramente mayor proporción de estas células en individuos TST+ en respuesta al estímulo con medio+anti-CD28 utilizado como agente co-estimulador, CFP-10, ESAT-6 y PPD en comparación con los individuos TST-, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre grupos. **Fig. 15A.**

Por último, la frecuencia de células T CD8 productoras de IL-17A fue muy similar entre los grupos IGRA+ e IGRA- en respuesta a la estimulación con medio+anti-CD28 y CFP-10, mientras que la frecuencia de células T CD8 productoras de IL-17 fue mayor en individuos IGRA- al estímulo con ESAT-6 en comparación con los individuos IGRA+, sin embargo no se observó diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Por otro lado, se observó mayor porcentaje de células T CD8 productoras de IL-17A en los individuos con IGRA+ al estímulo con PPD en comparación con los IGRA-, con diferencia estadísticamente significativa ($p=0.042$). **Fig. 15B.**



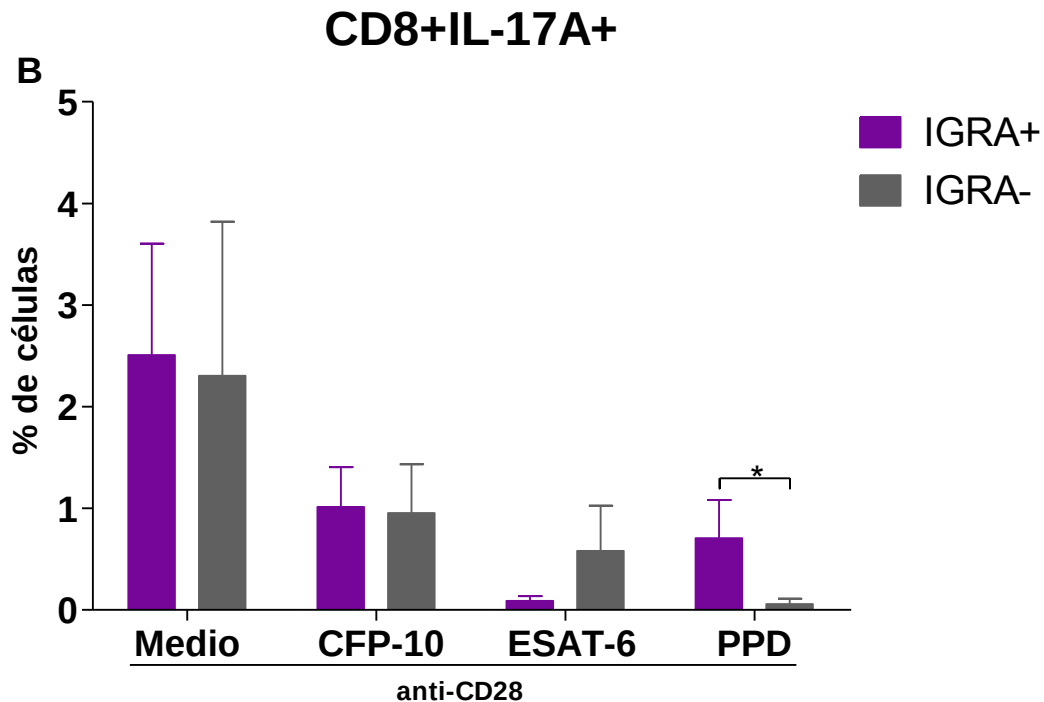


Fig. 15. Determinación de la proporción de células CD8+IL-17A+. Resultados del análisis de PBMC de los individuos seleccionados en respuesta al estímulo con Medio+anti-CD28, CFP-10, ESAT-6 y PPD, durante 7 días y analizadas por citometría de flujo, se realizó comparación entre grupos de **A)** TST+/TST-; **B)** IGRA+/IGRA-, con la prueba U de Mann-Whitney, un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

En la **Tabla 3** se muestra el análisis de los resultados obtenidos entre los grupos concordantes y discordantes de TST e IGRA. En primer lugar la frecuencia de células CD4+CD25+ fue mayor en los individuos TST+/IGRA+ en respuesta a PPD en comparación con los grupos TST-/IGRA+, con diferencia estadísticamente significativa ($p=0.022$). Sin embargo, en la respuesta a CFP-10 y ESAT-6 no hubo diferencia en la frecuencia de células CD4+CD25 entre los grupos concordantes y discordantes.

Por otra parte la frecuencia de células T CD4 productoras de IFN- γ fue mayor en los individuos TST+/IGRA- en respuesta a ESAT-6 en comparación con los TST-/IGRA- con diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.035$). Mientras el grupo TST+/IGRA+ mostró mayor frecuencia de células T CD4 productoras de IFN- γ , en respuesta a CFP-10 y PPD no se observó diferencia significativa entre grupos.

Además al estudiar la frecuencia de células T CD8 productoras de IFN- γ , no se observó diferencia en la respuesta a CFP-10, ESAT-6 y PPD, entre los grupos con resultados concordantes y discordantes en las pruebas de TST/IGRA. Es importante señalar que la frecuencia de células T CD8 productoras de IFN- γ fue mayor en comparación con la frecuencia de células T CD4 productoras de IFN- γ entre los diferentes grupos estudiados con el estímulo de CFP-10, ESAT-6 y PPD.

Mientras la frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17A fue mayor en los individuos TST-/IGRA+ en comparación con los individuos TST+/IGRA+ y TST+/IGRA- en respuesta a CFP-10, con significancia estadística de $p=0.010$ y 0.035 respectivamente; igualmente en el grupo TST+/IGRA+ hubo mayor frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17 con diferencia estadística de $p=0.036$ con respecto al grupo TST-/IGRA- en respuesta a CFP-10. Algo semejante ocurre en respuesta a ESAT-6 sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Finalmente, no se observó diferencia estadísticamente significativamente en la frecuencia de células T CD8 productoras de IL-17A en respuesta a CFP-10, ESAT-6 y PPD entre los grupos TST+/IGRA+, TST-/IGRA-, TST+/IGRA- y TST-/IGRA+. Por último es importante mencionar que la respuesta dada por esta población celular fue muy escasa en este estudio.

Tabla 3 Resultados de las poblaciones estudiadas en base a las pruebas TST e IGRA

Población Estímulo	TST+/IGRA+ Media % (DE)					TST+/IGRA- Media % (DE)					TST-/IGRA+ Media % (DE)					TST-/IGRA- Media % (DE)				
	CD4/CD25	CD4/IFN- γ	CD8/IFN- γ	CD4/IL-17	CD8/IL-17	CD4/CD25	CD4/IFN- γ	CD8/IFN- γ	CD4/IL-17	CD8/IL-17	CD4/CD25	CD4/IFN- γ	CD8/IFN- γ	CD4/IL-17	CD8/IL-17	CD4/CD25	CD4/IFN- γ	CD8/IFN- γ	CD4/IL-17	CD8/IL-17
CFP-10	3.71 (5.35)	6.59 (6.20)	11.11 (6.95)	0.48 (0.33)^{ab}	0.95 (1.71)	1.76 (1.09)	2.66 (1.26)	9.86 (3.97)	0.20 (0.12)^c	1.41 (1.56)	0.49 (0.62)	2.31 (1.25)	7.42 (0.84)	1.47 (0.18)^{bc}	1.39 (0.71)	3.84 (3.39)	0.95 (0.84)	5.07 (2.64)	0.05 (0.04)^a	0.18 (0.31)
ESAT-6	4.10 (6.18)	6.89 (5.53)	7.15 (5.46)	0.37 (0.42)	0.08 (0.19)	0.12 (0.23)	4.54 (3.41)^d	12.33 (6.74)	0.03 (0.03)	0.78 (1.61)	0.12 (0.20)	2.78 (0.13)	12.57 (3.66)	0.51 (0.23)	0.12 (0.20)	0.88 (0.89)	0.72 (0.54)^e	5.54 (2.36)	0.05 (0.04)	0.23 (0.27)
PPD	24.72 (19.96)^a	14.89 (11.80)	11.87 (8.76)	0.16 (0.37)	0.82 (1.65)	14.24 (15.89)	1.67 (1.81)	10.21 (10.51)	0.02 (0.04)	0.00 (0.01)	0.87 (1.45)^a	1.89 (0.45)	10.05 (7.92)	0.02 (0.04)	0.22 (0.38)	3.29 (3.02)	2.02 (2.54)	1.99 (0.92)	0.0 (0.0)	0.14 (0.24)
PMA+I	14.54 (21.98)	15.33 (10.36)^{bc}	27.49 (15.10)	1.43 (2.54)	0.64 (0.62)	1.06 (1.38)	5.00 (3.48)^d	20.71 (11.04)	0.55 (0.30)	2.74 (2.37)	0.33 (0.50)	3.23 (2.32)^e	15.15 (8.14)	1.81 (1.30)	2.39 (2.08)	14.75 (13.09)	0.77 (0.49)^{bc}	8.68 (5.26)	0.13 (0.11)	0.79 (0.63)
Anti-CD28	11.44 (12.02)	10.11 (7.97)^f	9.95 (8.77)	1.07 (2.05)	2.60 (4.87)	6.19 (13.03)	4.24 (3.57)	12.90 (6.93)	0.58 (0.39)	3.54 (5.19)	0.36 (0.63)	3.69 (0.30)	8.14 (2.33)	1.05 (0.91)	2.07 (1.24)	25.31 (22.06)	0.55 (0.89)^f	4.46 (3.14)	0.08 (0.13)	0.24 (0.41)

a p=0.036, b p=0.010, c p=0.035, d p=0.035, e p=0.022, f p=0.007, g p=0.022, h p=0.010, i p=0.035, j p=0.0220

12 DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar si había un perfil inmunológico que distinguiera a la población de trabajadores del CAIT que están en contacto constante con ganado infectado por *M. bovis*. Para ello se determinó la proporción y el fenotipo de las células productoras de IFN- γ e IL-17A, en respuesta a la estimulación *in vitro* con los antígenos ESAT-6, CFP10 y PPD entre los grupos de individuos con resultados de las pruebas TST+/TST- e IGRA+/IGRA-.

En la actualidad las pruebas de escrutinio (TST/IGRA) utilizadas para identificar la infección latente por Tb han sido señaladas como deficientes debido a la ausencia de un “estándar de oro”. Se han descrito discordancias entre el resultado de las pruebas TST e IGRA que se producen en el 10-20% de los individuos, aunque se desconoce realmente la razón de tales discrepancias [83]. Algunos de los factores descritos que podrían estar afectando el resultado son: la edad, la raza, el estatus de vacunación con BCG, enfermedades y tratamientos que deprimen la respuesta inmune, la prevalencia de Tb en la región y por lo tanto la exposición al agente causal, el estado de infección y de manera importante la variabilidad *per se* entre individuos [77, 80, 81].

Los individuos de este estudio tuvieron una concordancia de 66.6% y una discordancia de 33.3% entre las pruebas de TST e IGRA. Por otra parte, se comparó la frecuencia de células activadas que expresan CD25, el cual es también conocido como la cadena α de IL-2, entre los individuos TST+ vs. TST- se observó que la frecuencia de células CD4+CD25+ fue significativamente mayor en respuesta al estímulo con PPD, en comparación con los individuos TST-. La frecuencia de estas células fue similar en respuesta a los antígenos CFP-10 y ESAT-6 en individuos con TST+/TST-.

En cuanto a la frecuencia de las células CD4+CD25+ en los individuos IGRA+ vs. IGRA- no se observó ninguna diferencia significativa en los resultados de estos individuos. Nuestros resultados son comparables a los obtenidos por Sester y cols., donde evaluaron la frecuencia de células CD4+CD69+ (activadas) y observaron que en respuesta al estímulo con PPD, se indujo mayor proporción de células activadas en comparación con ESAT-6 y CFP-10 [84]. Otros investigadores obtuvieron resultados similares en un estudio en donde evaluaron PBMC de bovinos infectados por *M. bovis*, ellos encontraron que hubo sobre-expresión de CD25 en linfocitos T CD4 en respuesta a la estimulación con PPD [85]. Se sugiere que esta respuesta podría estar asociada a la mezcla de antígenos presentes en este compuesto [86].

Estos resultados, sugieren que el incremento de la frecuencia de células CD4+CD25+ en respuesta al estímulo *in vitro* con PPD, se podrían proponer para identificar asociación de infección latente con estado de activación celular. Sin embargo, es importante conocer más sobre la importancia de la activación celular y los mecanismos por los cuales estas células podrían participar en la contención de la infección como por ejemplo; la producción de citocinas, fagocitosis y proliferación en distintos estados de la infección.

Con respecto a la población de células T CD4 productoras de IFN- γ , se observó una mayor frecuencia de estas células en individuos con resultado positivo tanto para la prueba de TST como para la de IGRA, particularmente en los TST+ en respuesta a CFP-10 y ESAT-6, mientras en los IGRA+, solo en respuesta a ESAT-6 y PPD. Estos resultados son semejantes a los hallazgos de *Sutherland y cols.*, en donde compararon la producción de citocinas en respuesta a antígenos específicos de *M. tuberculosis* en individuos con diagnóstico de Tb activa, contactos con resultado TST+ definidos como latentes, e individuos sanos con TST-, y encontraron mayor proporción de células T CD4 productoras de IFN- γ en los contactos con TST+ en comparación con los TST- en respuesta al estímulo de la mezcla de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 [60].

Nosotros pensamos que la mayor proporción de células T CD4 productoras de IFN- γ en los individuos con resultado TST+ ó IGRA+ posiblemente se debe al tiempo de contacto de los trabajadores del CAIT con animales infectados por *M. bovis*, que fue de aproximadamente 210-240 horas por mes. Además, presentaban otros factores de riesgo para la predisposición y presentación de la infección y enfermedad, como vivir dentro de las instalaciones en las que se encontraba el ganado infectado por *M. bovis* y realizaban actividades que involucran el contacto constante con el ganado dentro del CAIT. *Papageorgiou y cols.*, también estudiaron una población con alta exposición a pacientes con Tb pulmonar activa con más y menos de 120 horas de exposición al mes, y observaron que hubo mayor proporción de células T CD4 productoras de IFN- γ bajo el estímulo de ESAT-6 en individuos con más de 120 horas de exposición, resultados que son similares a los nuestros [87].

Por otro lado, nuestro grupo analizó la frecuencia de células T CD4 productoras de IFN- γ en los grupos de individuos con TST/IGRA discordante y encontró que la respuesta es mayor en el grupo de individuos con ambas pruebas positivas y disminuye en los individuos con resultado negativo a una o ambas pruebas. Sin embargo, en nuestra población estudiada no hubo un grupo de individuos con baja exposición para hacer la comparación, por lo que sería necesario incluir esta

variable en futuros estudios, y probar si con menos tiempo de exposición, se podría observar menor porcentaje de células productoras de citocinas.

Cabe destacar que en comparación a la estimulación sólo con medio + anti-CD28 después de la estimulación con CFP-10 y ESAT-6, de manera interesante se disminuyó la frecuencia de células T CD4 productoras de IFN- γ tanto en individuos TST+/TST- como en IGRA+/IGRA-. Este efecto ha sido reportado por el grupo de *Wang y cols.*, los cuales han descrito la capacidad de ESAT-6 de inhibir la producción de IFN- γ por células T en humanos, después de estimular PBMC con *M. tuberculosis* o con anti-CD28 + anti-CD3 [88]. Sin embargo, el efecto inhibitorio de CFP-10 sobre la producción de IFN- γ por células T CD4 no ha sido observada en la literatura [89, 90].

En lo que se refiere a las células T CD8 productoras de IFN- γ , no se observó diferencia significativa en la frecuencia de estas células en respuesta al estímulo con medio + anti-CD28 (co-estimulador) y ESAT-6 entre los grupos TST+/TST- e IGRA+/IGRA-. En cambio, en respuesta al estímulo con CFP-10 y PPD se observó mayor frecuencia de estas células entre los grupos TST+ e IGRA+ en comparación con los individuos con resultado TST- e IGRA-, pero sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa. *Marín y cols.*, observaron resultados similares a los nuestros, como mayor frecuencia de células T CD8 productoras de IFN- γ en individuos con Tb latente comparado con individuos con Tb activa y sanos, después de la estimulación con CFP-10 y PPD [91]. Asimismo, en otro estudio se mostró que el estímulo con PPD induce mayor producción de IFN- γ en células T CD8 en individuos TST+ comparado con individuos sanos y con Tb pulmonar [76].

Lalvani y cols., analizaron la respuesta de células T CD8 en individuos con Tb latente y Tb activa, observaron de forma similar con nuestros resultados, un porcentaje mayor de células T CD8 productores de IFN- γ en respuesta al estímulo con los antígenos Ag85B, Esat-6, Hsp65 y una proteína de 16 kDa en individuos con Tb latente antes y después del tratamiento [92]. Estos resultados respaldan que la población de linfocitos T CD8 tienen una participación importante en el control de la infección por *M. tuberculosis* [93].

Se ha descrito que existe correlación entre la carga bacteriana y la frecuencia de células T CD8 específicas de antígeno en sangre periférica en humanos, esto puede ser porque las células T CD8 tienen la capacidad de lisar células infectadas del hospedero y eliminar directamente al microorganismo. [94] Este mecanismo podría presentarse en nuestra población por la exposición constante con bovinos infectados con *M. bovis*, aunque se desconoce la carga del bacilo en los

individuos. Por lo tanto, sería importante conocer el perfil de memoria que presentan las células T CD8, así como otros mecanismos efectores que estas células pueden ejercer sobre la estimulación con un microorganismo menos adaptado al humano.

Por otra parte en la frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17A, se observó variabilidad de la respuesta a los distintos estímulos probados, y de manera interesante se observaron porcentajes bajos con un promedio de 0.5% para células T CD4 y 1% para células T CD8 productoras de IL-17A. Sin embargo, hubo mayor frecuencia de esta población celular en los individuos con TST+ e IGRA+ en respuesta al medio + anti-CD28 y al PPD, pero no se observó diferencia significativa entre ambos grupos. En los individuos TST- se observó mayor frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17A en respuesta a CFP-10 con respecto a los TST+ sin alcanzar diferencia estadística entre grupos, además en respuesta a ESAT-6 hubo frecuencia similar de células T CD4 productoras de IL-17 entre individuos TST+ y TST-. Por el contrario, se observó mayor frecuencia de células T CD4 productores de IL-17A en los individuos IGRA+ en respuesta a CFP-10 y ESAT-6 en comparación con los IGRA-.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por un grupo de investigadores que cuantificaron la producción de IL-17 al estimular con CFP-10 las PBMC de individuos con Tb latente mediante el uso de unidades formadoras de Spots (SFU) y observaron que hubo mayor número de células en individuos con Tb latente en comparación con individuos sanos, aunque sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa [91].

Así mismo, otros autores mostraron resultados similares a los obtenidos en este estudio, en el cual analizaron individuos adultos sanos y altamente expuestos, que provenían de una zona con prevalencia extremadamente alta de Tb, y observaron mayor frecuencia de células T CD4 productoras de IL-17A bajo el estímulo de la mezcla de ESAT-6/CFP-10, en comparación con las células no estimuladas y la producción de IL-17A por las células T $\gamma\delta$ [48].

Aunque, se ha descrito a las células T $\gamma\delta$ como las principales productoras de IL-17A, nuestros resultados junto con otros estudios muestran que no sólo las células T $\gamma\delta$ son la fuente de IL-17A en la respuesta inmune contra la infección por *M. tuberculosis*, sino también las células T CD4, pero parece que esta respuesta depende más del estadio de la infección y el tiempo de exposición [55]. Por otra parte, es probable que la baja frecuencia con la que se observó la producción de IL-17A, sea debido a la compartimentalización de la respuesta inmune contra el bacilo de la Tb, sin embargo, nuestro estudio estuvo dirigido a medir la respuesta a partir de PBMC.

Por último, la frecuencia de células T CD8 productoras de IL-17A en los individuos TST+ e IGRA+ fue muy similar bajo el estímulo con medio + anti-CD28 (co-estimulador) y CFP-10 en comparación con los TST- e IGRA-. Interesantemente la frecuencia de estas células al estímulo con ESAT-6 fue mayor en los individuos IGRA- en comparación con los IGRA+, sin diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, de manera interesante se observó cierto efecto de inhibición por la estimulación con CFP-10 y ESAT-6 cuando comparamos la frecuencia de células T CD8 productoras de IL-17A en comparación con el medio + anti-CD28 como agente co-estimulador, sin haber que se haya descrito este efecto previamente. Finalmente, la frecuencia de las células T CD8 productoras de IL-17A en respuesta a PPD fue significativamente mayor en los individuos IGRA+ en comparación con los IGRA-. En la actualidad existen pocos estudios sobre el papel de las células T CD8 productoras de IL-17A en la infección por *M. tuberculosis*. Por ello sería interesante poder investigar más a fondo los mecanismos de control de esta población celular tanto en individuos con Tb latente como activa.

Algunas de las limitaciones en este trabajo fueron, que la población de estudio tenía características muy particulares como estar en contacto constante con animales infectados por *M. bovis* dentro del CAIT.

La co-existencia de la infección por *M. avium subsp. paratuberculosis*, en el ganado bovino, la cual se informó en un estudio llevado a cabo en el CAIT en 28 granjas lecheras y se encontró al menos un bovino seropositivo a la infección por *M. paratuberculosis*, la prevalencia fue de 8.86% [95]. En este estudio no se tomó en cuenta dicha enfermedad en los bovinos.

Por otra parte, todos los individuos del estudio estaban vacunados con BCG, por lo que fue difícil encontrar características tan particulares en las poblaciones de estudio reportadas hasta el momento.

La respuesta previa al estímulo no se pudo realizar debido al número limitado de células obtenidas de la sangre de los individuos del estudio, por ello, se deduce que la respuesta obtenida es la respuesta directa al estímulo de los antígenos utilizados.

13 CONCLUSIONES

Hubo variabilidad en el perfil inmunológico en cada grupo de individuos estudiado

El antígeno con más capacidad de inducir respuesta inmune fue el PPD

Los antígenos CFP-10 y ESAT-6 tienen un efecto inhibidor en la producción de citocinas en este modelo experimental

En esta población se pudo definir que los individuos con tuberculosis latente son los que tienen pruebas positivas de TST e IGRA

Es necesario estudiar en la población la respuesta inmune innata y humoral con resultado negativo de las pruebas TST e IGRA para analizar su perfil inmunológico

14 LITERATURA CITADA

1. Kumar, V. and S.L. Robbins, Robbins basic pathology. 8th ed 2007, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xiv, 946 p.
2. Global tuberculosis report 2014. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
3. Smith NH, et al. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nat Rev Microbiol, 2006. 4(9): 670-81.
4. Collins CH, Yates MD, and Grange JM. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. J Hyg (Lond), 1982. 89(2): 235-42.
5. Garnier T, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(13): 7877-82.
6. Rehren G, et al. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2007. 87(4): 347-59.
7. Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis (Edinb), 2001. 81(1-2): 71-7.
8. Colletti T, and Robinson P. Strep throat: guidelines for diagnosis and treatment. JAAPA, 2005. 18(9): 38-44.
9. Glickman MS, and Jacobs WR, Jr. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell, 2001. 104(4): 477-85.
10. Patrick R. Murray, K.S.R., Michael A. Pfaller Cap.28 *Mycobacterium* in Microbiología Médica 2009, Elsevier-Mosby.: España. p. pp. 277-290.
11. Lin PL, and Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a moving target. J Immunol, 2010. 185(1): 15-22.
12. Villalba Caloca, J., Valdespino Gómez, J., Anzaldo Flores, G., Balandrano Campos, S., Bobadilla del Valle, M., García Cruz, A., García García, M., Mancilla Jiménez, R., Martínez Estévez, J., Olvera Díaz, H., Olvera C., R., Palacios Martínez, M., Quiroz Huerta, G., Sada Díaz, E., Santos Preciado, J., Sifuentes Osornio, J., Vaca Marin, M. and Yañez Velasco, L. (1999). Tuberculosis. In: Diez problemas relevantes de salud pública en México, 1st ed. México, D.F.: Fondo cultural económico, pp.59-85.

13. Morris CD, Bird AR, and Nell H. The haematological and biochemical changes in severe pulmonary tuberculosis. *Q J Med*, 1989. 73(272): 1151-9.
14. Behr MA, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*, 1999. 353(9151): 444-9.
15. Sifuentes-Osornio J, et al. [Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican patients. I. Clinical features and risk factors]. *Rev Invest Clin*, 1995. 47(4): 273-81.
16. Sarrazin H, et al. Association between tuberculin skin test reactivity, the memory CD4 cell subset, and circulating FoxP3-expressing cells in HIV-infected persons. *J Infect Dis*, 2009. 199(5): 702-10.
17. Mori T, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. 170(1): 59-64.
18. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*, 2011. 2011: 814943.
19. Miranda C, Tomford JW, and Gordon SM. Interferon-gamma-release assays: Better than tuberculin skin testing? *Cleve Clin J Med*, 2010. 77(9): 606-11.
20. Cobat A, et al. Two loci control tuberculin skin test reactivity in an area hyperendemic for tuberculosis. *J Exp Med*, 2009. 206(12): 2583-91.
21. Huebner RE, Schein MF, and Bass JB. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*, 1993. 17(6): 968-75.
22. Pai M, Zwerling A, and Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*, 2008. 149(3): 177-84.
23. Diel R, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*, 2011. 37(1): 88-99.
24. La tuberculosis en la región de las Américas, Informe Regional 2014, Epidemiología, control y financiamiento. Available from: <http://www.paho.org/hq/index.php>.

25. Misión de Evaluación Externa del Programa de Control de Tuberculosis-Reporte final de la Secretaría de Salud de México, 2013.; Available from: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reporte_final_mexico.pdf.
26. Brosch R, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(6): 3684-9.
27. Bovine Tuberculosis, T.C.f.F.S.a.P.H.; Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf.
28. John M. Grange, Mario Ravignole, Jeffrey R. Stark Wing Wai Yew, Tuberculosis a Comprehensive Clinical Reference. 1th ed ed. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and related animal pathogens, ed. H.S.S.a.A. Zumla2009: SAUNDERS.
29. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*--New York City, 2001-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2005. 54(24): 605-8.
30. Wedlock DN, et al. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. Microbes Infect, 2002. 4(4): 471-80.
31. Michel AL, Muller B, and van Helden PD. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? Vet Microbiol, 2010. 140(3-4): 371-81 .
32. de Kantor IN, and Ritacco V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. Vet Microbiol, 2006. 112(2-4): 111-8.
33. Cosivi O, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis, 1998. 4(1): 59-70.
34. de la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risk, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis (Endib), 2006. 86(2): 77-109.
35. Thoen C, Lobue P, and de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet Microbiol, 2006. 112(2-4): 339-45.
36. Cleaveland S, et al. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. Tuberculosis (Edinb), 2007. 87(1): 30-43.

37. Muller B, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*, 2013. 19(6): 899-908.
38. Torres P, et al. Prevalence of Latent and Active Tuberculosis among Dairy Farm Workers Exposed to Cattle Infected by *Mycobacterium bovis*. *Small PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013. 7(4): 2177.
39. Perez-Guerrero, L., et al., [Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico]. *Salud Publica Mex*, 2008. 50(4): 286-91.
40. Flynn JL, and Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: 93-129.
41. Zuniga J, et al. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012: 193923.
42. Sester M, et al. Management of tuberculosis in HIV infection: where T-cells matter. *Eur Respir J*, 2010. 35(3): 475-6.
43. Campos-Neto A, et al. CD40 ligand is not essential for the development of cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 1998. 160(5): 2037-41.
44. Balcewicz-Sablinska MK, et al. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol*, 1998. 161(5): 2636-41.
45. Cosmi L, et al. Detection by flow cytometry of ESAT-6- and PPD-specific circulating CD4+ T lymphocytes as a diagnostic tool for tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007. 143(1): 1-9.
46. Streitz M, et al. Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 2007. 2(8): 735.
47. Murray RA, et al. Bacillus Calmette Guerin vaccination of human newborns induces a specific, functional CD8+ T cell response. *J Immunol*, 2006. 177(8): 5647-51.
48. Scriba TJ, et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol*, 2008. 180(3): 1962-70.
49. Lazarevic V, and Flynn J. CD8+ T cells in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 166(8): 1116-21.

50. Sousa AO, et al. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(8): 4204-8.
51. Albert ML, Sauter B, and Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 1998. 392(6671): 86-9.
52. De Libero G, and Mori L. The T-Cell Response to Lipid Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol*, 2014. 5: 219.
53. Ouyang W, Kolls JK, and Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 2008. 28(4): 454-67.
54. Harrington LE, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 2005. 6(11): 1123-32.
55. Khader SA, and Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence*, 2010. 1(5): 423-7.
56. Lin Y, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity*, 2009. 31(5): 799-810.
57. Schwander S, and Dheda K. Human lung immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: insights into pathogenesis and protection. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. 183(6): 696-707.
58. Umemura M, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*, 2007. 178(6): 3786-96.
59. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: 393-422.
60. Sutherland JS, et al. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Eur J Immunol*, 2009. 39(3): 723-9.
61. Chen X, et al. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4⁺ T Cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 181(7): 734-42.

62. Okamoto Yoshida Y, et al. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol*, 2010. 184(8): 4414-22.
63. Torrado E, Robinson RT, and Cooper AM. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol*, 2011. 32(2): 66-72.
64. Behr MA, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999. 284(5419): 1520-3.
65. Parkash O, Singh BP, and Pai M. Regions of differences encoded antigens as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans. *Scand J Immunol*, 2009. 70(4): 345-57.
66. Brodin P, et al. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun*, 2006. 74(1): 88-98.
67. Chandra Rai R, et al. Early secretory antigenic target-6 of *Mycobacterium tuberculosis*: enigmatic factor in pathogen-host interactions. *Microbes Infect*, 2012. 14(13): 1220-6.
68. Ganguly N, Siddiqui I, and Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis (Edinb)*, 2008. 88(6): 510-7.
69. Lewis KN, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis*, 2003. 187(1): 117-23.
70. Scarpellini P, et al. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(8): 3469-74.
71. van Pinxteren LA, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000. 7(2): 155-60.
72. Kim CH, et al. Comparative analysis of whole-blood interferon-gamma and flow cytometry assays for detecting post-treatment Immune responses in patients with active tuberculosis. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014. 86(4): 236-43.

73. Rueda CM, et al. Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN-gamma in human latent and active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010. 90(6): 346-53.
74. Huang Y, et al. Relatively low level of antigen-specific monocytes detected in blood from untreated tuberculosis patients using CD4+ T-cell receptor tetramers. *PLoS Pathog*, 2012. 8(11): 1003036.
75. Petruccioli E, et al. IFNgamma/TNFalpha specific-cells and effector memory phenotype associate with active tuberculosis. *J Infect*, 2013. 66(6): 475-86.
76. Redelman-Sidi G, and Sepkowitz KA. IFN-gamma release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. 188(4): 422-31.
77. Dheda K, et al. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med*, 2009. 15(3): 188-200.
78. Barry CE 3rd, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol*, 2009. 7(12): 845-55.
79. Walzl G, et al. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(5): 343-54.
80. Machado A Jr, et al. Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009. 13(4): 446-53.
81. Nienhaus A A, Schablon, and R Diel. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB infection--analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test. *PLoS One*, 2008. 3(7): 2665.
82. Olsen I. and Sollid LM. Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells. *J Immunol Methods*. 2013; 390:106–12.
83. Jones-López EC. et al. Cough Aerosol Cultures of : Insights on TST / IGRA Discordance and Transmission Dynamics. *PLoS One*, 2015; 10(9): 138358.
84. Sester U, Fousse M, Dirks J, et al. Whole-Blood Flow-Cytometric Analysis of Antigen-Specific CD4 T-Cell Cytokine Profiles Distinguishes Active Tuberculosis from Non-Active States. *PLoS One*, 2011; 6(3): 17813.

85. Waters WR, et al. Expression of I-Selectin (CD62L), CD44, and CD25 on Activated Bovine T Cells .Infection and Immunity. 2003; 71(1): 317-326.
86. Prasad TSK, Verma R, Kumar S, et al. Proteomic analysis of purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical proteomics. 2013;10(1): 8.
87. Papageorgiou CV, et al. Flow Cytometry Analysis of CD4+IFN- γ + T-Cells for the Diagnosis of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. Cytometry Part B. 2015.
88. Wang X, Barnes PF, Huang F, et al. Early Secreted Antigenic Target of 6-kD Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Primes Dendritic Cells to Stimulate Th17 and Inhibit Th1 Immune Responses. Journal of immunology. 2012; 189(6): 3092-3103.
89. Wang X, Barnes PF, Dobos-Elder KM, et al. ESAT-6 inhibits production of IFN-gamma by *Mycobacterium tuberculosis*-responsive human T cells. J. Immunol. 2009; 182: 3668–3677.
90. Samten B, Wang X, Barnes PF. *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses.Tuberculosis. 2009; 89:S74–S76.
91. Marin ND, Paris SC, Rojas M, Garcia LF. Functional profile of CD4+ and CD8+ T cells in latently infected individuals and patients with active TB. Tuberculosis. 2013; 93: 155–166.
92. Caccamo N, Guggino G, Meraviglia S, et al. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific CD8 T-Cells in Patients with Active Tuberculosis and in Individuals with Latent Infection. PLoS ONE. 2009; 4(5):p.e5528.
93. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, et al. Human cytolytic and interferon γ -secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95(1): 270-275.
94. Prezzemolo, T, Guggino G, La Manna MP, et al. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Frontiers in Immunology. 2014; 5:180.
95. Bandera, M. Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el CAIT, Hgo, México., in FMVZ, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F.