

Roxanna Marisol
Layseca Gress

Detección de proteínas inmunogénicas de *Mycobacterium tuberculosis* con suero
de pacientes en el estadio latente de la enfermedad

2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Detección de proteínas inmunogénicas de
Mycobacterium tuberculosis con suero de
pacientes en el estadio latente de la
enfermedad

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

ROXANNA MARISOL LAYSECA
GRESS

DIRIGIDO POR:

BERTHA ISABEL CARVAJAL GAMEZ

CO-DIRECTOR:

JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

FEBRERO, 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



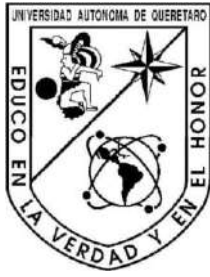
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

**“Detección de proteínas inmunogénicas de *Mycobacterium tuberculosis*
con suero de pacientes en el estadio latente de la enfermedad”**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Lic. Roxanna Marisol Layseca Gress

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carbajal Gámez

Co-Dirigido por:

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

SINODALES


Dra. Bertha Isabel Carbajal Gámez
Presidente

Dr. Jorge A. Barrios Payán
Codirector


Dr. José A. Cervantes Chávez
Vocal

Dra. Rosa M. Pérez Serrano
Suplente


Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.
Suplente




Firma




Firma



Firma



Firma



Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

20 de octubre 2023

México

“Para hacerme poderosa solo
necesito una cosa: educación”

Malala Yousafzai

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas tienen una elevada tasa de incidencia sobre la población global. Esto provoca un impacto considerable en el sector de la salud mundial. Entre las enfermedades más importantes a este nivel se encuentra la tuberculosis, la cual concentra el 95% de los casos y muertes reportadas en países en desarrollo. Existen diversos factores que dificultan el diagnóstico de esta enfermedad, en donde uno de los más importantes es el estadio de latencia que puede durar años en el paciente sin poder ser diagnosticada a tiempo. Por esto, es importante generar vías de detección actualizadas que nos puedan brindar un diagnóstico oportuno y certero, lo anterior se logrará teniendo en cuenta la red compleja de interacciones que hay de por medio en una enfermedad infecciosa. Para poder llegar a este nivel de entendimiento es necesario realizar estudios traslacionales y multidisciplinarios. La proteómica, nos brinda una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por un organismo en un momento dado y bajo condiciones determinadas, ayudando dilucidar biomarcadores importantes en las interacciones microorganismo-hospedero presentes en la fase de latencia, permitiéndonos realizar un diagnóstico completo. En el presente trabajo se evaluó la interacción de los sueros de los pacientes que presentaban tuberculosis latente y activa con proteínas totales de *M. tuberculosis* cepa H37RV. Se observó un perfil de reconocimiento diferente entre los sueros de los pacientes, en donde el suero con tuberculosis activa reconoció proteínas de entre 51 kDa a 66 kDa, mientras que el suero con tuberculosis latente logró el reconocimiento de proteínas que iban desde los 94 kDa a los 35 kDa. Mismos extractos proteicos se sometieron a espectrometría de masas para su identificación, en donde se pudieron identificar a la familia de proteínas PE-PGR las cuales son expresadas bajo condiciones ambientales de bajo pH o baja de nutrientes, y AG85A la cual tiene como función unir a la micobacteria con el macrófago y la evasión del sistema inmune.

Palabras clave: tuberculosis, latencia, proteómica, diagnóstico, proteínas.

ABSTRACT

Infectious diseases have a high incidence rate on the global population. This has a considerable impact in the global health sector. Among the most important diseases at this level is tuberculosis, which accounts for 95% of the cases and deaths reported in developing countries. There are many factors that make the diagnosis of this disease difficult, one of them is the latency stage, which can last for years in the patient without being able to be diagnosed in time. For this reason, it is important to generate updated detection pathways that can provide us with a timely and accurate diagnosis. This will be achieved taking in consideration the complex network of interactions involved in an infectious disease. In order to reach this level of understanding, it is necessary to carry out translational and multidisciplinary studies. Proteomics provide us with a dynamic picture of all expressed proteins by an organism at a given time and under specific conditions, helping to elucidate important biomarkers in the microorganism-host interactions present in the latency phase, allowing us to make a complete diagnosis. In this work, the interaction of sera from patients with latent and active tuberculosis with total proteins of *M. tuberculosis* strain H37RV was evaluated. A different recognition profile was observed between patients at different stages of the disease, where the sera with active tuberculosis recognized proteins between 51 - 66 kDa, while the sera with latent tuberculosis achieved the recognition of proteins ranging from 94 - 35 kDa. The same protein extracts were subjected to mass spectrometry for identification. We found two families of proteins, one of them were the PE-PGR family, this proteins are expressed under environmental conditions of low pH and low nutrients, and AG85A involved in the binding of the mycobacteria with the macrophage and the evasion of the immune system.

Key words: tuberculosis, latency, proteomics, diagnosis, proteins.

DEDICATORIAS

A mi tía Ruth Gress Pérez, quien siempre tuvo especial orgullo por mi gusto por la ciencia, quien me apoyó durante mis años académicos y quien lamentablemente ya no nos acompaña en este plano terrenal. Que en paz descanse. Mi corazón esta lleno de orgullo por haber sido tu sobrina.

A familia, mis padres Liliana y Eduardo y a mi hermana, Melissa Layseca, quienes siempre me ha mostrado su cariño y fuerza para que yo siga estudiando.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Liliana Gress, Eduardo Layseca, Ruth Pérez, y a mi hermana Melissa Layseca por su incondicional apoyo y cariño otorgado a lo largo de toda mi trayectoria académica.

A Conahcyt por brindar los recursos durante toda la maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, que ha sido mi hogar desde mi educación media superior, Licenciatura y Maestría.

Al Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por brindarme las instalaciones para poder desarrollar mi investigación.

A la M. en C. Blanca Estela Tovar Velázquez por su guía en el desarrollo de todo este trabajo de investigación.

Al Dr. Luis Enrique Becerril Villanueva por el apoyo brindado para los análisis de espectrometría de masas tipo shot gun.

A todos los miembros de mi comité, el Doctor Jorge Alberto Barrios Payán y a la Doctora Bertha Isabel Carvajal Gamez, pilares importantes en esta investigación, ya que sin su asesoramiento esta tesis no habría podido llevarse a cabo. A la Doctora Rosa Martha Pérez Serrano quien me permitió trabajar en su laboratorio y el acceso a sus equipos. Al Doctor Juan Joel Mosqueda Gualito por asesorarme y también permitirme el uso de las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Vacunas.

A todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Proteogenómica, en especial a Max Carstensen y Erik David Martínez Rubio quienes me pudieron apoyar y brindar parte de su tiempo y conocimiento.

A mis amigos más queridos, César Augusto, Daniela Enoe, Leonor, Citlalli, Wendoline, Adriana y Daniel por su amistad, apoyo, y cariño durante todos estos años. Gracias por no dejarme vencer.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	13
II. ANTECEDENTES	14
2.1 Características microbiológicas	14
2.2 Patogenicidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
2.3 Epidemiología de la enfermedad	17
2.4 Respuesta inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.5 Inmunidad Innata	21
2.6 Formación del granuloma	26
2.7 Inmunidad adaptativa	26
2.8 Inmudidad adaptativa en tuberculosis latente	27
2.9 Evasión contra la respuesta inmune de <i>M. tuberculosis</i>	29
2.10 Anticuerpos y las células B en la enfermedad por tuberculosis en el estado latente	31
2.11 Inmunoproteómica de la tuberculosis	32
III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVOS	34
4.1 General	34
4.2 Específicos	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5. 1 Preparación de las muestras	35
5.2 Suero de pacientes	35
5.3 Controles y criterios de inclusión	35
5.4 Monitoreo de la latencia	36
5.5 Extracción de proteínas	36
5.6 Purificación de proteínas de la biomasa bacteriana	37
5.7 Cuantificación por Bradford	38

5.8 Electroforesis SDS-PAGE en 1D	38
5.9 Transferencia a membrana de nitrocelulosa, Western Blot y revelado de membrana	39
5.10 Identificación del proteoma de <i>M. tuberculosis</i>	40
5.11 Disposición de desechos	41
VI. RESULTADOS	42
6. 1 Confirmación de la fase latente	42
6.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	42
6.3 Integridad de proteínas	44
6.4 Inmunodetección de las proteínas por medio del suero de los pacientes	45
6.5 Identificación del proteoma de <i>M. tuberculosis</i>	46
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. CONCLUSIÓN	51
IX. REFERENCIAS	52
X. ANEXOS	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de las muestras de proteínas.	43
Cuadro 2. Resultados de las proteínas identificadas por espectrometría de masas tipo shot gun.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencias en tasa de incidencia TB TF, porcentaje de éxito de tratamiento y tasa de mortalidad Tb Tf, México 1990-2019.	18
Figura 2. Tasa de incidencia de TB TF por entidad federativa, México 2019.	19

Figura 3. Progresión de la enfermedad por tuberculosis respecto al tiempo. Tomada y modificada de Drain et al., 2018.....	20
Figura 4. Evasión del reconocimiento de las células T, contra la activación de las células T por células presentadoras de antígeno infectadas por <i>M. tuberculosis</i> . Tomada y modificada de Boom et al., 2021.....	30
Figura 5. Curvas de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> . A) Patrón de crecimiento de la cepa H37RV. B) Patrón de crecimiento de la cepa 1556.....	42
Figura 6. Regresión lineal para la cuantificación de proteínas de <i>M. tuberculosis</i> , cepas H37RV y 1556.....	43
Figura 7. Análisis de integridad de las proteínas extraídas. Carriles: 1) marcador de peso molecular en kDa; 2 y 5) perfil proteico de la cepa H37RV; 3 y 4) perfil proteico de la cepa 1556; 6) control positivo, perfil proteico de E.coli TOP1.....	45
Figura 8. Detección de proteínas inmunogénicas con el suero de pacientes en diferentes tipos de infección con tuberculosis.....	46
Figura 9. Diagrama de Venn en donde se conjuntan en grupos de localización, las diferentes proteínas identificadas por medio de la espectrometría de masas tipo shot gun, pertenecientes a <i>M. tuberculosis</i>	47

ABREVIATURAS Y SIGLAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
ACT	Alfa-1-antiquimiotripsina
ADC	Albumin-Dextrose-Catalase, "Albúmina-dextrosa-catalasa"
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag85	Complejo antigénico 85
AGP1	Alfa-1-ácido glicoproteína
ATB	Active Tuberculosis, "Tuberculosis activa"
ATI	Alveolar Type I, "Tipo alveolar" I
ATII	Alveolar Type II, "Tipo alveolar" II
BAAR +	Bacilo Ácido Resistente
BCG	Bacillus Calmette-Guerin, "Bacilo Calmette-Guerin"
cCD	Células dendríticas convencionales
CCL19	Chemokine (C-C motif) Ligand 19, "Ligando de quimioquinas 19"
CCL21	Chemokine (C-C motif) Ligand 21, "Ligando de quimioquinas 21"
CD	Células dendríticas
CD103	Clusters of Differentiation 103, "Clúster de diferenciación 103+"
CD11b ⁺	Clusters of Differentiation 11b+, "Clúster de diferenciación 11b+"
CD3	Clusters of Differentiation 3, "Clúster de diferenciación 3"
CD4	Clusters of Differentiation 4, "Clúster de diferenciación 4"
CD8	Clusters of Differentiation 8, "Clúster de diferenciación 8"
CDH1	e-cadherina
CFP10	Cyan Fluorescent Protein 10, "Proteína cyan fluorescente 10"
CLI	Células Linfoides Innatas
Da	Dalton
DC SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin, "No integrina de captación de ICAM específica de células dendríticas"
DosR	Regulón DosR

DURT	Donor-UnRestricted T, "Células T no restringidas a donador"
EDR-TB	Extensive Drug Resistant Tuberculosis, "Tuberculosis extensivamente resistente a fármacos"
EMB	Etambutol
ESAT6	Early Secretory Antigenic Target 6, "Antígeno temprano secretor blanco 6"
EsxH	ESAT6 secretion system H
Fc	Fragment Crystallizable, "Fragmento cristalizabile"
Fc γ	Gamma Fragment Crystallizable, "Fragmento cristalizabile gama"
FRA	Fluido del Revestimiento Alveolar
GRAIL	Gene Related to Anergy in Lymphocyte, "Anergía regulada por genes en los linfocitos"
HBHA	Heparin-Binding Haemagglutinin Adhesin, "Adhesina hemaglutinante de unión a heparina"
HSPX	Heat Shock Protein X, "Proteína de choque de calor X"
IFN- γ	Gamma Interferon, "Interferón gama"
IgA	Immunoglobulin A, "Inmunoglobulina A"
IgG	Immunoglobulin G, "Inmunoglobulina G"
IGRA	Interferon-Gamma Release Assays, "Ensayo de liberación de interferón gama"
IL-1	Interleukin 1, "Interleucina 1"
IL-10	Interleukin 10, "Interleucina 10"
IL-12	Interleukin 12, "Interleucina 12"
IL-17	Interleukin 17, "Interleucina 17"
IL-1 α	Interleukin 1 alpha, "Interleucina 1 alfa"
IL-1 β	Interleukin 1 beta, "Interleucina 1 beta"
IL-2	Interleukin 2, "Interleucina 2"
IL-22	Interleukin 22, "Interleucina 22"
IL-23	Interleukin 23, "Interleucina 23"
IL-36 α	Interleukin 36 alpha, "Interleucina 36 alfa"
IL-6	Interleukin 6, "Interleucina 6"

IL-8	Interleukin 8, "Interleucina 8"
INH	Isoniazida
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase, "Sintasa de óxido nítrico inducible"
kDa	Kilodalton
L	Litro
LAM	Lipoarabinomanano
LTBI	Latent Tuberculosis Infection, "Infección de tuberculosis asintomática latente"
LTi	Lymphoid tissue inducer, "Células linfoides inductoras de tejido"
M1	Macrófagos activados clásicamente
M2	Macrófagos activados exclusivamente por citocinas
MA	Macrófagos alveolares
MB	Macrófagos bronquiales
MDR-TB	Multiple Drug Resistant Tuberculosis, "Tuberculosis resistente a múltiples fármacos"
mg	Miligramos
MHC	Major Histocompatibility Complex, "Complejo principal de histocompatibilidad"
MHC-II	Major Histocompatibility Complex - II, "Complejo principal de histocompatibilidad - II"
MI	Macrófagos intersticiales
min	Minuto
mL	Microlitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
moCD	Células dendríticas derivadas de monocitos
ng	Nanogramo
NK	Células Natural Killer
nm	Nanómetro
NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, "Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos"
OmpA	Outer Membrane Protein A, "Proteína de membrana externa A"

ON	Overnight
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern Molecules, "Patrones moleculares asociados a patógenos"
PBS	Phosphate Buffered Saline, "Solución salina tamponada"
PBS-Tween	Phosphate Buffered Saline with Tween, "Solución salina tamponada con Tween"
pCD	Células dendríticas plasmocitoides
PS	Proteínas sufactantes
PTB	Present Tuberculosis, "Tuberculosis presente"
PZA	Pirazinamida
R2	R-Squared, "R cuadrada"
RD1	Region of Deletion 1, "Región de delección 1"
RIF	Rifampin
RLC	Receptor de Lectina tipo C
rpm	Revoluciones por minuto
RRP	Receptores de Reconocimiento en Patrón
RTN	Receptores Tipo NOD
S100A9	S100 calcium-binding protein A9, "S100 proteína de unión a calcio A9"
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfate, "Dodecilsulfato de sodio"
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, "Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio"
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido
T-CD4 ⁺	Células T CD4
T-CD4 ⁺ Reg	Células T Cd4 reguladoras
T-CD8 ⁺	Células T CD8
TB	Tuberculosis
TB Spot	Prueba diagnóstica sanguínea de tuberculosis
TB TF	Tuberculosis de todas las formas
TBP	Tuberculosis Pulmonar

TCA	Tricarboxylic Acid Cycle, "Ciclo del ácido tricarboxílico"
TEMED	Tetramethylethylenediamine, "Tetrametiletilenediamina"
TGF- β	Transforming growth factor beta, "Factor de crecimiento transformador beta"
Th1	Type 1 T helper cell, "Célula T auxiliar tipo 1"
Th17	Type 17 T helper cell, "Célula T auxiliar tipo 17"
Th2	Type 2 T helper cell, "Célula T auxiliar tipo 2"
TLR	Toll Like Receptor, "Receptor tipo toll"
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha, "Factor de necrosis tumoral alfa"
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane, "Tris(hidroximetil)aminometano"
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
PE-PGR	Familia de proteínas con secuencias polimórficas ricas en GC
H37Rv	Cepa prototipo
1556	Cepa obtenida de un paciente de Veracruz
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa, transmitida casi exclusivamente por aerosoles causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bacteria usualmente ataca a los pulmones, pero también puede atacar a cualquier otro órgano del cuerpo, tales como el riñón, cerebro y columna vertebral (OMS, 2021). Principalmente se caracteriza patológicamente por inflamación granulomatosa necrotizante en el pulmón (presente aproximadamente en el 85% de los casos). Aunque también existen variantes de la enfermedad que pueden atacar a los huesos y causar deformidades esqueléticas (Dheda *et al.*, 2016).

En la actualidad la tuberculosis constituye una enfermedad reemergente como consecuencia de la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos tradicionalmente empleados en el tratamiento de la enfermedad. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud, un total de 1.4 millones de personas murieron de tuberculosis en 2019 (entre ellas 208,000 personas con VIH) y se estima que en el mismo año 10 millones de personas se enfermaron en todo el mundo. México es considerada una zona endémica de la enfermedad, debido a que el 98% de la población ha estado en contacto con micobacterias en algún punto de su vida (OMS, 2021).

Algunos estudios de modelaje, a pesar de sus limitantes, sugieren que la eliminación de la tuberculosis se puede alcanzar en el año de 2050, solo si las intervenciones diagnósticas y terapéuticas tales como la detección temprana de casos y alta tasa de cura, son combinadas con estrategias preventivas, como vacunas o la búsqueda de nuevos biomarcadores de la enfermedad (Dye *et al.*, 2013).

En el presente proyecto se plantea encontrar, con una metodología más accesible y de bajo costo, proteínas que puedan funcionar como biomarcadores para el estadio latente de la enfermedad, ya que existen muy pocos reportados, y los que se reportan se obtienen con una metodología de alto costo tales como la prueba de liberación de interferón gamma IGRA, y la prueba TB Spot (Chegou *et al.*, 2009)(Hoffmann *et al.*, 2018) .

II. ANTECEDENTES

2.1 Características microbiológicas

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo no móvil, no formador de esporas y aeróbico con una pared celular con alto contenido de lípidos de alto peso molecular. El crecimiento de esta bacteria es lento, con un tiempo de generación de 15 a 20 horas, y es visible en un medio sólido, toma de tres a ocho semanas. Tiende a crecer en grupos paralelos, produciendo una forma de cordón serpentino, una de sus características que la contrastan de forma muy radical con otras bacterias es que ~~M. tuberculosis~~ *M. tuberculosis* tiene una porción muy grande de genes que codifican para enzimas que se involucran en la lipogénesis y lipólisis (González-Martin, 2014). Adicionalmente, una característica importante de esta bacteria es que se trata de un bacilo acidorresistente (BAAR +), esto nos permite identificarla por medio de la tinción Ziehl-Nielsen. En este tipo de tinción los bacilos aparecen levemente doblados y en forma de varillas con cuentas de 2 a 4 μm de largo y de 0.2 a 5 μm de amplitud (Delogu et al., 2013). Cuando se trata de una muestra de esputo, usualmente los organismos se ubican paralelamente o dos organismos que se adhieren en forma de V. Se estima que se requieren 10,000 organismos/mL de esputo para que un frotis sea considerado como positivo (Mendell & Douglas, 2018).

Existen dos tipos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*: 1) Tuberculosis resistente a múltiples fármacos (o MDR-TB del inglés: Multi Drug Resistent), la cual es prácticamente incurable por el tratamiento estándar de primera línea. 2) Tuberculosis extensivamente resistente a fármacos (EDR -TB), en donde la resistencia presentada por la bacteria incluye a los antibióticos de primera línea tanto como de segunda línea, tales como la isoniazida y rifampicina más cualquier fluoroquinolona y al menos uno de tres fármacos de segunda línea, como la amikacina, kanamicina, y capreomicina (Ezewudo et al., 2018). Según el Centro para el control y la Prevención de Enfermedades (CDC), los fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis son: Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), etambutol (EMB), pirazinamida (PZA) (OMS, 2021; (Mariam et al., 2004).

2.2 Patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis*

En lo que corresponde a los mecanismos de patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis* el papel central se le atribuye a los lípidos efectores y el metabolismo de los lípidos que utiliza la micobacteria. La envoltura celular de *M. tuberculosis* difiere substancialmente de la estructura de la pared celular de las bacterias gram-negativas y gram-positivas. Esta contiene una larga capa hidrofóbica de ácidos micólicos, una cadena larga ramificada de ácidos grasos que existen unidos covalentemente a la pared celular o en la forma unida no covalentemente en la forma trehalosa dimicolato (Smith, 2003). Así como también posee una gran variedad de lípidos y glicolípidos que se asocian no covalentemente a la envoltura de la bacteria, lo que le confiere una gran hidrofobicidad (Glickman & Jacobs, 2001). Muchos de estos compuestos tienen una actividad biológica potente cuando se examinan en sistemas *in vitro* de células eucarióticas, por lo que se genera la posibilidad de que puedan ser importantes para la patogénesis de la bacteria. El lipoarabinomano, que es un glicolípido asociado a la pared celular, se ha estudiado y se ha corroborado que puede inhibir la activación del interferón gamma en los macrófagos, puede inducir la liberación de TNF- α de los macrófagos, y puede recoger radicales libres de oxígeno (Maulén, 2011). La trehalosa dimicolato puede producir inflamación granulomatosa, atrofia del timo y toxicidad de la mitocondria y también afecta a la fusión de membrana en estudios con modelos (Hauser, 2020); Saparito *et al.*, 1991).

La familia de los lípidos complejos del dimicocerosato de tiocerol en las envolturas celulares de las micobacterias patógenas pueden suprimir la respuesta de los linfocitos, y también pueden unirse a laminina del nervio periférico facilitando la invasión en las células de Schwann (Gorocica *et al.*, 2005).

El nicho intracelular protege a la micobacteria de los componentes celulares y humorales del sistema inmune. Para superar los mecanismos de defensa de las células del hospedador, *M. tuberculosis* revierte el paso a través de la vía endocítica para formar un compartimento membranoso replicativo distinto, la micobacteria también ha sido capaz de inducir rupturas vacuolares para alcanzar nutrientes en el citosol del hospedador y para escapar de las vías de defensas del mismo, favoreciendo así su crecimiento. Por lo mismo, una gran cantidad de estudios

proteómicos han sido requeridos para coleccionar un inventario de factores celulares del hospedador que se requieren para establecer una colonización bacteriana a un nivel celular (Hoffmann *et al.*, 2018).

Es importante hacer notar que los lípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* representan un 60% de su peso total en seco, y se ha mostrado que estos mismos son traficados fuera de las vacuolas que contienen a la micobacteria (Kolattukudy *et al.*, 1997). Estudios posteriores revelaron que estos lípidos bacterianos actúan en diversos procesos celulares tales como respuesta inmune, apoptosis metabolismo, transporte de vesículas y transducción de señales (Shui *et al.*, 2009).

M. tuberculosis secreta proteínas que usualmente son blancos de las respuestas inmunes en el hospedador infectado (Kinhikar *et al.*, 2006). Hasta la fecha se han descrito cerca de 200 proteínas y se han caracterizado cerca de 30 proteínas que la bacteria secreta, sin embargo, la actividad inmunológica de estas aún se desconoce (Gomez *et al.*, 2000).

Entre los factores de virulencia proteicos se encuentra la proteína HSPX. Esta proteína es considerada como un importante elemento controlador de la latencia de *M. tuberculosis*, debido a que su sobreexpresión inhibe el crecimiento del microorganismo (Álvarez-Jiménez *et al.*, 2018). Otros elementos importantes son Esat6/CF-10, proteínas de filtrado celular cuyos genes estructurales están contenidos en la región RD1, la cual está presente en todas las cepas virulentas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Brosch *et al.*, 2002).

Por otra parte, la lipoproteína de 19 kDa induce la expresión y secreción de ciertos péptidos antimicrobianos a través de los receptores tipo toll (TLR's) en células epiteliales de pulmón, los cuales son capaces de eliminar a la micobacteria. Sin embargo, se observó que cepas avirulentas no inducen la expresión de este tipo de péptido y es posible que la presencia de esta molécula esté ligada a factores de resistencia natural y pueda variar entre individuos debido a polimorfismos genéticos (Álvarez *et al.*, 2009).

La señalización de TLRs en forma prolongada por *M. tuberculosis* y la lipoproteína 19 kDa, inhibe ciertas respuestas del macrófago al IFN-g, particularmente aquellas relacionadas a la expresión de MHC-II y la presentación de antígenos. Esta inhibición posiblemente promueve la evasión de *M. tuberculosis* a la respuesta inmune mediada por las células T, lo que implica la persistencia de la infección en la enfermedad (Pai *et al.*, 2004).

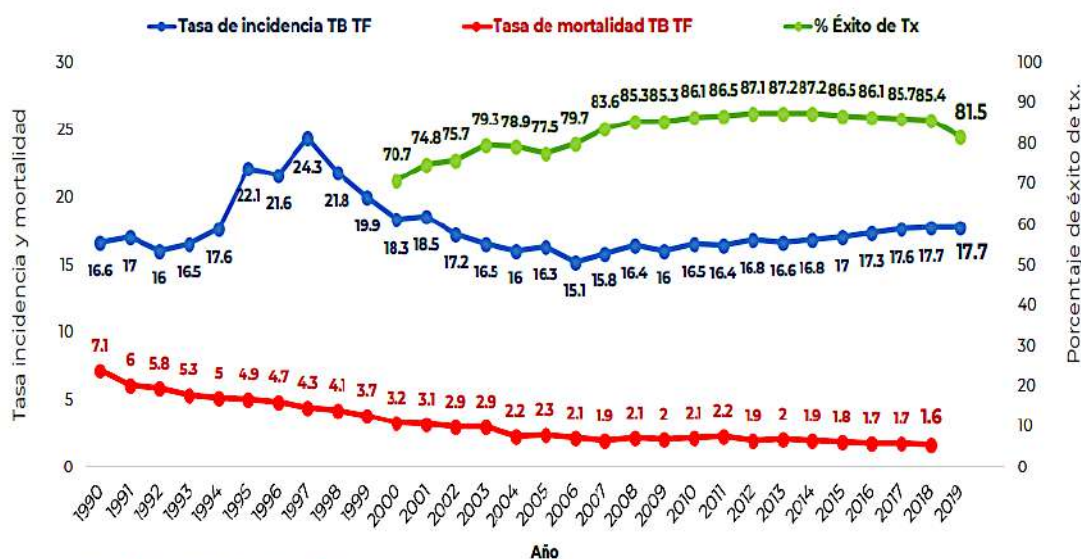
Se conoce además que OmpA, proteína familia de las porinas y encontrada en *M. tuberculosis* H37Rv, juega un papel fundamental en la respuesta bacteriana frente a condiciones de pH ácido. Otro de los factores de virulencia proteicos reportados son HBHA, MTP40 y el complejo antigénico 85 (Ag85) (Raynaud *et al.*, 2002).

2.3 Epidemiología de la enfermedad

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de alto impacto a nivel mundial debido a que es la principal causa de muerte en la población adulta. Se calcula que esta enfermedad ha matado a cerca de 1 billón de personas en los últimos dos siglos y que al menos un tercio de la población mundial (cerca de 1.7 billones de personas) están infectadas con *M. tuberculosis*. Esta enfermedad ha sido considerada de emergencia de salud pública mundial durante los últimos 25 años. Está presente en todos los países y grupos de edad, además de que se trata de una enfermedad curable y prevenible. En la actualidad las formas de tuberculosis resistente a fármacos se han considerado como los patógenos más letales del mundo, responsables por un cuarto de muertes mundiales debido a la resistencia de antimicrobianos (Floyd *et al.*, 2018). Se considera que, en todo el mundo, la tuberculosis es una de las 10 principales causas de muerte y la principal causa por un único agente infecciosos (por encima del VIH/SIDA). La tuberculosis multirresistente sigue representando una crisis de salud pública y una amenaza para la seguridad sanitaria, en el año 2023 se detectaron y notificaron en todo el mundo un total de 206,030 personas con tuberculosis multirresistente o resistente a rifampicina (OMS, 2023). Estudios de modelaje sugieren que la eliminación de la tuberculosis se puede alcanzar en el año de 2050, solo si las intervenciones diagnósticas y terapéuticas (detección temprana de casos y alta tasa

de cura) son combinadas con estrategias preventivas (tales como vacunas o la búsqueda de nuevos biomarcadores de la enfermedad) (Dye et al., 2013).

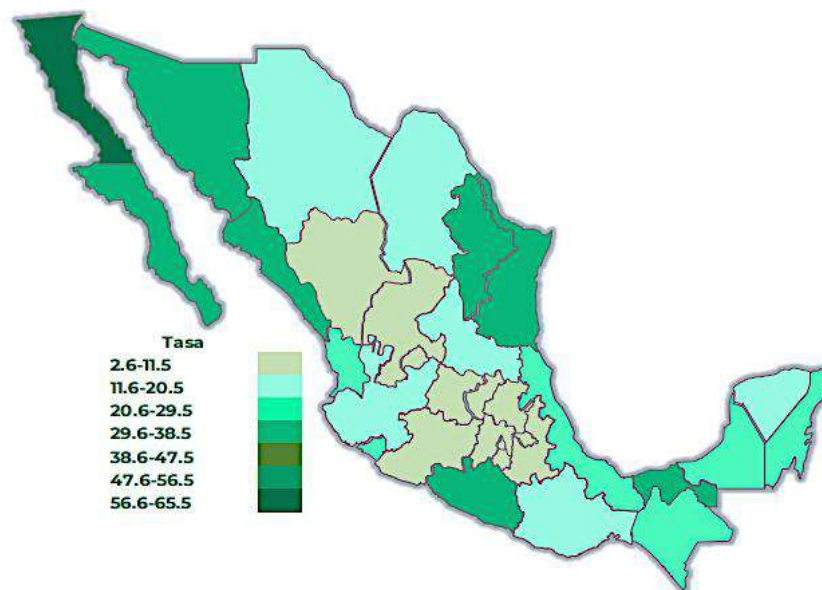
Según los reportes de la Organización Mundial de la Salud, México es uno de los treinta países con alta carga de tuberculosis en el mundo. En el año 2019 México notificó 22,285 casos de TB en todas sus formas (TB TF), de los cuales 17,818 (79.95%) fueron de presentación pulmonar (TBP), con una tasa de prevalencia nacional de 17.6 casos nuevos por cada 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2023). La incidencia de TB en México se ha mantenido relativamente estable durante la última década, con una ligera disminución de 21 casos por 100, 000 habitantes en 2010 a 20 casos por 100,000 habitantes en 2019. Sin embargo, el país aún presenta problemáticas en el diagnóstico y tratamiento de tuberculosis, particularmente en poblaciones vulnerables, tales como personas que viven con infecciones tales como el VIH, y comunidades indígenas (OMS, 2023).



Fuente: SS/DGE/Anuarios de Morbilidad, 1990-2020. Cohorte 2019
Mortalidad: SS/DGIS/CUBOS de Información Dinámica, * 2019. Población CONAPO.

Figura 1. Tendencias en tasa de incidencia TB TF, porcentaje de éxito de tratamiento y tasa de mortalidad Tb Tf, México 1990-2019.

En el año 2022 se registraron más de 28 mil casos de tuberculosis en México, de los cuales el 30% de los portadores desconocía que portaba al bacilo (Secretaría de Salud, 2022). Más de la mitad de todos los municipios del país, notifican casos de la enfermedad cada año, se considera que la enfermedad existe en todo el territorio mexicano, sin embargo, las entidades federativas de mayor número de nuevos casos y muertes por esta causa son: Baja California, Veracruz, Guerrero, Tamaulipas, Chiapas, Nuevo León y Tabasco. La mayor concentración de afectados se encuentra en las grandes ciudades o municipios de mayor número de población (Tijuana, Mexicali, Cd. Juárez, Veracruz, Acapulco, Reynosa, Matamoros, Hermosillo, Tuxtla Gutiérrez, Tapachula, Monterrey y Tabasco, entre los principales). Por entidad federativa, las mayores tasas de incidencias reportadas fueron: Baja California (65.4), Sonora (37.3), Baja California Sur y Sinaloa (33.2) y Tamaulipas (33.1). De los datos reportados, la tuberculosis en forma pulmonar representa el 80%, 2.1 % de forma meníngea y 17.9% otras formas (Secretaría de Salud, 2022).



Fuente: SS/DGE/ Sistema Integral de Vigilancia Epidemiológica de TB.
*Tasa de incidencia por 100,000 habitantes

Figura 2. Tasa de incidencia de TB TF por entidad federativa, México 2019.

2.4 Respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*

La transmisión de *M. tuberculosis* ocurre tras la inhalación de aerosoles conteniendo gotas con bacteria viva. Para que la transmisión sea exitosa hay varias condiciones que tomar en cuenta tales como la proximidad y duración del contacto con un individuo con tuberculosis activa (o ATB por sus siglas en inglés) y también la competencia del sistema inmune del individuo infectado con *M. tuberculosis* (Dheda et al., 2016).

La infección por esta bacteria presenta diferentes estados que van desde la forma de infección asintomática latente (LTBI) a un estado de infección activa (Figura 3). Mientras que la mayoría de individuos que se exponen a *M. tuberculosis* pueden ser capaces de controlar la infección en la forma de LTBI, se estima que un 5 -10% de las personas expuestas desarrollan ATB. Esta forma de enfermedad es caracterizada por tos persistente acompañada por la producción de esputo, pérdida de peso, debilidad y sudores nocturnos (Cardona & Ruiz-Manzano, 2004).

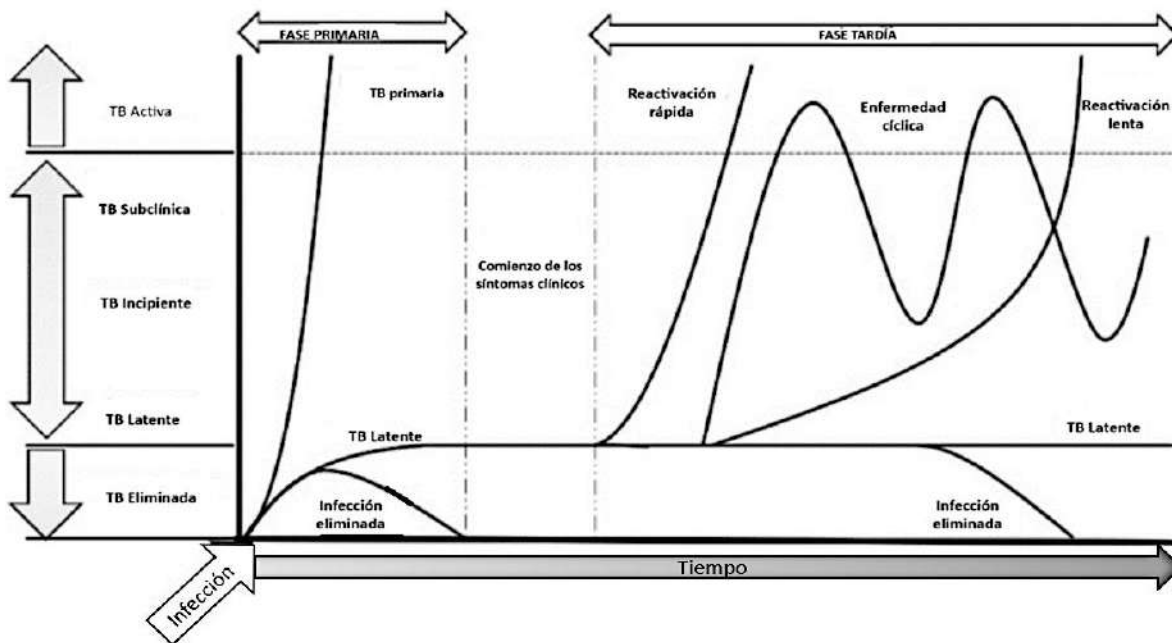


Figura 3. Progresión de la enfermedad por tuberculosis respecto al tiempo. Tomada y modificada de Drain et al., 2018.

Una vez que la bacteria ha sido inhalada por medio del aerosol debe sobrevivir a la barrera mucosa para posteriormente, residir en el alveolo, sitio en el cual *M.*

tuberculosis causara una agregación de diversas células inmunes en sitios de infección, seguido a esto se formarán estructuras parecidas a nódulos denominadas granulomas. Estos granulomas constriñen al patógeno y dentro de los mismos se llevan a cabo interacciones dinámicas entre la bacteria y el hospedador. Existen estudios en primates no humanos que indican que los granulomas formados tras la infección de *M. tuberculosis*, son diferentes morfológicamente respecto a si hay una infección activa o latente (Cadena et al., 2017) así como también presentan diferente capacidad de controlar la capacidad bacteriana (Lin et al., 2014).

2.5 Inmunidad Innata

La primera línea de defensa en las infecciones provocadas por *M. tuberculosis* en el organismo hospedador se da por las células innatas del sistema inmune en los pulmones, que son principalmente macrófagos, células dendríticas, monocitos, y neutrófilos que se encargan de fagocitar fácilmente a la bacteria. Una vez fagocitados es indispensable transformar ese fagosoma en compartimientos antimicrobianos acidificados para poder eliminarla, por lo que para que esto se cumpla debe haber una liberación de IFN- γ , contribución importante del sistema inmune adaptativo por medio de las células CD4 y CD8. Esta misma molécula puede activar a células mieloides e inhibir la replicación bacteriana e incluso es considerada como antimicobacterial (Chai et al., 2020).

La exposición al ambiente exterior para el intercambio de gases hace a los pulmones un portal principal para patógenos respiratorios, incluidas las micobacterias. Es por esto que, para poder rechazar la entrada de materiales no benéficos para el organismo, la superficie de las vías respiratorias del hospedero ha evolucionado para cubrirse de un rango de células epiteliales con unión estrecha entre ellas, las cuales componen la barrera mucosa de las vías respiratorias. El epitelio de los conductos de las vías respiratorias, que incluyen a la tráquea, bronquios y bronquiolos, se constituyen principalmente de células ciliadas y células Clara, así como también de células caliciformes, células neuroendocrinas, y células basales regenerativas. Las células caliciformes y las células mucosas de las glándulas submucosas producen continuamente el moco de las vías respiratorias que superpone el epitelio de las vías

respiratorias y en conjunto con las células ciliadas permiten mantenerla libre de patógenos y otras partículas (Roy et al., 2014). El moco de las vías respiratorias se caracteriza por ser un gel viscoelástico que contiene en abundancia mucinas altamente glicosiladas y múltiples componentes antibacteriales tales como: inmunoglobulinas, lisozimas, y varias citocinas (Nicholas et al., 2006). Las mucinas son esenciales para acomodar microbios comensales en la capa externa del moco y aliviar el impacto de las enfermedades infecciosas que se puedan presentar (Whitsett, 2014). Las defensinas del hospedador, las cuales son el componente bactericida más importante del fluido mucoso, pueden interrumpir la envoltura micobacteriana, convirtiéndola así en una fuente potencial para desarrollar fármacos contra la tuberculosis (AlMatar et al., 2018). La inmunoglobulina secretora A (IgA) es el principal isotipo de inmunoglobulina que baña a las superficies mucosas para prevenir la adherencia de patógenos y neutralizar sus toxinas (Brandtzaeg, 2013).

Diferente a la superficie de la tráquea, bronquios y bronquiolos, la superficie epitelial alveolar está cubierto principalmente de células epiteliales tipo I y tipo II (ATI y ATII, respectivamente). Las ATI contribuyen el 90% de la pared alveolar y juegan un papel central en el intercambio de gases debido a su fenotipo largo y aplanado (Crapo et al., 1982), mientras que las ATII sirven como progenitoras de las ATI debido a que se pueden diferenciar a ATI en ciertas condiciones (Ghosh et al., 2013).

Las células alveolares epiteliales están equipadas con múltiples receptores de reconocimiento en patrón (o RRP) incluyendo TLR y receptores de lectina tipo C (RLC), y receptores tipo NOD (RTN), los cuales son necesarios para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de *Mycobacterium tuberculosis* y evocar respuestas inmunes proinflamatorias con la subsecuente secreción de varias citosinas. Tras la activación, las células epiteliales promoverán los efectos bactericidas intracelulares de los macrófagos, así como también promoverán el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos a los sitios de infección (Eghtesad et al., 2001).

Recientemente se reveló el rol que puede jugar el fluido del revestimiento alveolar (FRA) en la inmunidad de la mucosa del hospedero. Inicialmente se sabía que este líquido jugaba un papel crucial en mantener las funciones normales en la fisiología del pulmón. Este líquido se constituye de 90% lípidos surfactantes, y 10% de proteínas

asociadas (Veldhuizen et al., 1998). Aparte de péptidos antimicrobianos, e inmunoglobulinas, varias biomoléculas antimicobacteriales, incluyendo proteínas surfactantes (PS), proteínas del complemento, e hidrolasas homeostáticas, también se han identificado en FRA. Se conocen cuatro tipos de PS (PS-A, PS-B, PS-C, y PS-D), la PS-A hidrofílica y la PS-D son miembros de las lectinas tipo C, llamadas colectinas. Ambas presentan efectos bactericidas en diversos patógenos respiratorios, incluyendo a las micobacterias, ya que contienen en sus dominios C terminal que se pueden unir a un amplio rango de PAMP. PS-A y PS-D también pueden actuar en las células inmunes pulmonares tales como macrófagos, neutrófilos y linfocitos para potenciar su actividad antimicrobiana (Han & Mallampalli, 2015). Las ATI pueden entregar diversas proteínas del complemento en el FRA, incluyendo C2, C3, C4 y C5 (Strunk et al., 1988).

Las hidrolasas del pulmón en el FRA también muestran efectos modificantes en la envoltura de *M. tuberculosis*, disminuyendo en un 60 a 80% la adhesión y la supervivencia intracelular dentro de macrófagos humanos (Arcos et al., 2011). Existen estudios que muestran que las hidrolasas presentes en la FRA potencian la matanza intracelular de las bacterias en los neutrófilos, con un aumento en la molécula TNF- α y la interleucina- 8 (IL-8) (Arcos et al., 2015).

Es importante mencionar el rol que cumplen los macrófagos que residen en los pulmones durante la inmunidad contra *M. tuberculosis*. Estos mismos cumplen un papel importante en la remoción de un amplio espectro de partículas, alérgenos y microorganismos que se transmiten por el aire, incluyendo a *M. tuberculosis*. Según sea su localización podemos catalogar a estos macrófagos en: macrófagos bronquiales (MB), macrófagos alveolares (MA), macrófagos intersticiales (MI) (Kopf et al., 2015). Son los MA, los que principalmente se ha reconocido como los principales en fagocitar a las micobacterias invasoras, gracias a los RRP (Westphalen et al., 2014)(Liu et al., 2017). Es a través de estos RRP que pueden reconocer los PAMP en la superficie de la micobacteria y así fagocitarla en el fagosoma para su posterior eliminación. Este proceso puede ser bloqueado por una serie de proteínas efectoras de ciertas cepas de *M. tuberculosis* (Ehrt & Schnappinger, 2011). En respuesta a una infección con *M. tuberculosis*, una serie de citosinas pro inflamatorias y quimoquinas, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-23 y el factor estimulante de colinas

de granulocitos y macrófagos son regulados en los MA humanos (Silver et al., 2009)(Gleeson et al., 2016). También los MA infectados con *M. tuberculosis* presentan una alta expresión de sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y péptidos antimicrobianos (Nicholson et al., 1996)(Rivas-Santiago et al., 2008). Los AM se han considerado esenciales en mantener la homeostasis inmune de las vías respiratorias debido a su plasticidad y polarización. Estos pueden diferenciarse en macrófagos activados clásicamente (M1) con actividad proinflamatoria o en macrófagos activados alternativamente con función anti inflamatoria, dependiendo de la variedad de estímulos de las biomoléculas en el microambiente del pulmón durante la infección (Hussell & Bell, 2014)(Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Está generalmente aceptado que los macrófagos M1 promueven la formación del granuloma y las respuestas inflamatorias contra la infección por *M. tuberculosis* (Marino et al., 2015), mientras que en contraste la micobacteria puede polarizar a los MA hacia un fenotipo parecido a las M2 por medio de la regulación de IL-10 y TGF- β anti inflamatorias, y así tengan una incapacidad de presentar el antígeno (Bonecini-Almeida et al., 2004)(O'Leary et al., 2011).

Las células dendríticas residentes del pulmón (CD) son otro conjunto de células centinela que patrullan los conductos de las vías respiratorias y el lumen de los alveolos para probar a los antígenos. Existen tres tipos de estas células con linajes de desarrollo independientes, en el primer tipo se incluyen las CD convencionales (cCD), luego están las CD plasmocitoides (pCD), y por último las CD derivadas de monocitos (moCD) (Kopf et al., 2015). El reconocimiento de *M. tuberculosis* por los CD requiere de la colaboración de los receptores DC SIGN y de los TLR, cuya activación resulta en la producción de IL-12, que promueve la migración de las CD al nodo linfático mediastinal para preparar la respuesta de las células T-CD4⁺ (Tallieux et al., 2003)(Bafica et al., 2005). La respuesta T helper tipo 1 (Th1) específica para *M. tuberculosis* es mediada por las cCD CD11b⁺, mientras que simultáneamente esta contra regulada por las cCD CD103⁺ a través de la producción de la producción de la IL-10 (Wolf et al., 2007)(Lai et al., 2018). Las moCD han mostrado regular las IL-1 α , IL-1 β e iNOS para poder eliminar a *M. tuberculosis* (Mayer-Barber et al., 2011).

Los neutrófilos son el tipo de célula que más se recluta en las lesiones ocasionadas por la tuberculosis. Estas células contribuyen a la resistencia contra *M. tuberculosis*,

ya que producen péptidos catelicidina LL-37 y lipocalina 2 para restricción bacteriana (Martineau et al., 2007). Este tipo de células también han demostrado en estudios anteriores, que ayudan a facilitar la migración de las CD y ejercen efectos protectores por medio de una matanza oxidativa de la micobacteria en los granulomas típicos de la tuberculosis (Blomgran & Ernst, 2011). También se ha propuesto que los neutrófilos cooperan íntimamente con los macrófagos contra *M. tuberculosis* en lesiones pulmonares, por medio de la producción de citosinas y gránulos, lo que beneficia el reclutamiento y activación de ambos tipos de células (Tan et al., 2006). Estas células también han demostrado que liberan vesículas extracelulares para comunicación intercelular, lo que puede promover la producción de anión superóxido en los macrófagos y potenciar la autofagia anti *M. tuberculosis* (Alvarez-Jiménez et al., 2018).

Dentro de la inmunidad innata también se incluyen a las células linfoides innatas (CLI). Estas células son un subconjunto de linfocitos que enriquecen la superficie de las mucosas, tales como las del intestino y las de los pulmones y son los que actúan tempranamente en la infección por *M. tuberculosis* (Vacca et al., 2019). Las CLI carecen de receptores específicos de antígeno, por lo mismo no son restringidos por el MHC, pero ellos reflejan las funciones de los linfocitos adaptativos. De acuerdo con sus diferentes factores de transcripción y funciones efectoras, las CLI pueden categorizarse en cinco grupos: Células natural killer (NK), CLI1, CLI2, CLI3, y células linfoides inductoras de tejido (LTi) (Vivier et al., 2018)(Emgård et al., 2018). Las células que ejercen un efecto protector contra infecciones micobacterianas en el pulmón son las células NK que producen IFN- γ (Feng et al., 2006)(Lai et al., 2018). También hay estudios que demuestran que las células NK humanas pueden unirse directamente a la superficie micobacteriana y ejercer una actividad citotóxica (Esin et al., 2008). En otros estudios se ha demostrado por medio de modelos murinos que la expansión de las CLI3 mediada por la IL-23 puede inducir la producción de IL-17 e IL-22, las cuales juegan un papel crucial en la inmunidad innata temprana contra *M. tuberculosis* (Ardain et al., 2019). Este tipo de células no experimentan expansión y selección clonal en respuesta a estímulos. En vez de esto, estas células se caracterizan por la rápida reacción a señales de daño e infección para evocar respuestas inmunes del hospedero y mecanismos de protección (Chai et al., 2020).

2.6 Formación del granuloma

El granuloma característico de la tuberculosis es una estructura altamente heterogénea con una composición variada de células. Estudios recientes acerca de esta estructura indican un rango de otras células inmunes innatas que pueden estar involucradas en la defensa del huésped anti-*M. tuberculosis*. Los mastocitos, basófilos, y eosinófilos son células efectoras que juegan diversos roles esenciales en inflamación alérgica y enfermedades autoinmunes principalmente. Los mastocitos se originan de las células madre hematopoyéticas y migran a tejido mucoso, incluyendo en el pulmón, en donde se someten a una diferenciación terminal (Rigoni et al., 2018). En el caso de una infección por *M. tuberculosis* los mastocitos son activados para ayudar a controlar la diseminación de la bacteria promoviendo la respuesta Th1 y direccionando a las células T CD8⁺ al pulmón en una manera dependiente de TLR2 (Carlos et al., 2009). Los mastocitos también son capaces de producir péptidos antimicrobianos y la liberación de histamina durante la desgranulación, misma que está asociada con la inflamación del pulmón durante la infección con *M. tuberculosis* (Babu et al., 2019). Adicionalmente, vale la pena hacer notar que hay varias células que no son clásicas del sistema inmune que pueden estar participando en la inmunidad del hospedero contra *M. tuberculosis*, tal es el caso de las células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, células madre mesenquimales, adipocitos y células neuronales, dado que *M. tuberculosis* tiene una capacidad invasiva omnipotente hacia diversos tipos de células y podría despertar respuestas de defensa integradas por las células del huésped (Randall et al., 2015., Chai et al., 2018).

2.7 Inmunidad adaptativa

Las respuestas inmunes adaptativas contra *M. tuberculosis*, las cuales son detectables 3 a 8 semanas después de la infección, forman un papel crítico en el resultado de la infección por la bacteria. Estas respuestas están compuestas principalmente por respuestas de las células CD4⁺ específicas de antígeno

(Jasenosky et al., 2015). Existen una extensa variedad de poblaciones de células T que se involucran en el proceso de inmunidad, tales como las células T CD4⁺ Th1, Th2 y Th17 y células T CD8⁺ citotóxicas (Robinson et al., 2015).

Una función importante de la inmunidad innata durante una infección con *M. tuberculosis* es preparar las respuestas inmunes adaptativas. Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno que inician la inmunidad adaptativa presentando antígenos de *M. tuberculosis* en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), moléculas coestimuladoras y citosinas (Tian et al., 2005).

Una vez que se ha dado la infección por *M. tuberculosis*, las células dendríticas maduran y migran a los ganglios linfáticos que drenan el pulmón para iniciar respuestas de las células T específicas de antígeno, las cuales dependen del receptor de quimoquinas CCL19 y CCL21 (Bhatt et al., 2004).

Una vez iniciada esta respuesta, existe una respuesta protectora de Th1 controlada por IL-1 e IL-12 mediada por las células CD4⁺ que a su vez secretan IL-2 lo que lleva a la estimulación y producción de células T de memoria (Mogues et al., 2001).

Las células T gamma/delta producen IFN- γ , y son las primeras células que detectan a la bacteria, mientras que las células T CD8 son las que inducen apoptosis, secretan citoquinas para remoción de los fagocitos que ya han fagocitado la célula infectada (van Pinxteren et al., 2000)

A pesar de la presión que ejerce el sistema inmune sobre *M. tuberculosis*, esta es capaz de persistir en el hospedador. Por lo anterior, el diagnóstico clínico y tratamiento de la infección por *M. tuberculosis* se complica por una variedad de coinfecciones y comorbilidades (Sia & Rengarajan, 2019).

2.8 Inmunidad adaptativa en tuberculosis latente

El término de tuberculosis latente (o LTBI, por sus siglas en inglés) se define según la OMS, como un estado de respuestas inmunes persistentes en los pacientes ante antígenos de *M. tuberculosis*, sin evidencia de manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad por tuberculosis activa (OMS., 2023). Esta condición identifica a los

individuos que han estado en contacto con el bacilo y han desarrollado respuestas inmunes, esto debido a que un número pequeño de bacilos quedan en dormancia pero viables contenidos en el granuloma, los cuales pueden reactivarse y causar TB activa (Getahun et al., 2015). Debido a que no es posible detectar a bacilos latentes *in vivo*, aún no se pueden analizar individuos con LTBI de los que puedan haber eliminado a la micobacteria. Sin embargo, se sabe que la mayoría de las respuestas inmunes a *M. tuberculosis* que definen una LTBI, refleja el control a la exposición del bacilo (Jasenosky et al., 2015).

Las respuestas inmunes adaptativas se ven reflejadas en el papel de las células T, las cuales son críticas para contener exitosamente al bacilo por los macrófagos en los granulomas, y muchos subconjuntos de células T responden a un amplio rango de antígenos de *M. tuberculosis*. Entre esos subconjuntos se encuentran las células T restringidas por MHC, y las células T no restringidas a donador (o por sus siglas en inglés DURTS) (Lindestam Arlehamn et al., 2014). Siendo las células T CD4⁺ restringidas a MHC II las que poseen un rol dominante en controlar a la micobacteria (Jasenosky et al., 2015; Mayer-Barber & Barber, 2015).

Las células T CD4⁺ polifuncionales que expresan IFN- γ , TNF- α e IL-2 se asocian con respuestas protectoras, y las células T CD4⁺ efectoras y de memoria que responden a los antígenos de *M. tuberculosis* se encuentran en el fluido bronco alveolar en personas con LTBI (Silver et al., 2003). Además, existen respuestas inmunes contra el bacilo provenientes de las células T CD4⁺ Reg y TH17 en una LTBI, pero su rol en controlar la infección aún no es claro (Boom et al., 2021).

Las células T CD4⁺ activadas por el bacilo, ayuda a los macrófagos a controlar a la micobacteria intracelular, a través de la secreción de las citosinas y a la función de los linfocitos T citotóxicos (Ernst, 2018; Mayer-Barber & Barber, 2015; Tsukaguchi et al., 1995). Pero también los subconjuntos de estas células dan funciones de ayuda para otro tipo de células involucradas en una LTBI, tales como las células T CD8⁺ y la expansión de células DURT, así como también para la producción de anticuerpos por las células B (Crotty, 2015; Laidlaw et al., 2016) .

Mientras que el papel de protección de estas células T CD4⁺ está muy bien entendido en un contexto de una LTBI, los antígenos clave reconocidos de *M. tuberculosis* por

las células T aún no se han identificado. Sin embargo se ha reportado que, las células T CD4⁺ y las células T CD8⁺, provenientes de pacientes con LTBI, demuestran una amplia reactividad a péptidos de *M. tuberculosis* (Lindestam Arlehamn et al., 2014; Yang et al., 2018). Durante el estado de dormancia, se han reportado genes como el del regulón DosR, el cual se encuentra expresado bajo esta condición, y se ha reportado que pacientes con LTBI han reconocido antígenos que se codifican por medio de este regulón, sin embargo, no se ha podido demostrar una correlación certera sobre esto. Por lo que aún no se reportan antígenos que sean específicos del estado de la enfermedad, solo un número limitado de antígenos son reconocidos por la mayoría de los individuos con LTBI (Black et al., 2009; Schuck et al., 2009). Antígenos expresados por moléculas MHC en células infectadas con *M. tuberculosis* permanecen, en gran parte desconocidos. Por lo que identificar estos antígenos es esencial para definir la clave protectora de las células T en pacientes con LTBI (Boom et al., 2021).

Las células T CD8⁺ que responden a *M. tuberculosis* se encuentran en la sangre periférica y en el fluido bronco alveolar en pacientes con tuberculosis latente, y tienen como función principal prevenir la diseminación del bacilo (Cadena et al., 2017; Lewinsohn et al., 2017; Mayer-Barber & Barber, 2015)

2.9 Evasión de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*

Existen múltiples investigaciones acerca de cómo esta micobacteria puede evadir el sistema inmune. Cuando se trata de evadir la respuesta inmune innata, el bacilo puede interrumpir la fusión y el desarrollo del fagolisosoma, resistir la muerte por el superóxido que se genera en ese mismo fagolisosoma, autofagia, y apoptosis (Ernst, 2018; Mayer-Barber & Barber, 2015; VanderVen et al., 2016; Weiss & Schaible, 2015).

M. tuberculosis también desarrollo diversas estrategias para poder evadir el reconocimiento por medio de células T CD4⁺ de las células infectadas (Figura 4) (Boom et al., 2021). De estas estrategias, se ha observado que las lipoproteínas pertenecientes al bacilo pueden activar la señalización por TLR2 en los macrófagos, lo que por consiguiente inhibirá la expresión de las moléculas de MHC II (Harding &

Boom, 2010) . También, la micobacteria también tiene la capacidad de excretar proteínas, una de las más estudiadas es EsxH, misma que le permite interferir con la activación de las células T CD4⁺ (Portal-Celhay et al., 2016). Otra estrategia que se ha estudiado, es la manera en la que las células dendríticas infectadas por *M. tuberculosis* pueden exportar antígenos a células que no se encuentran infectadas, lo que resulta en la limitación de la presentación de antígenos y la activación de las células T CD4⁺ también se ve comprometida (Srivastava et al., 2016).

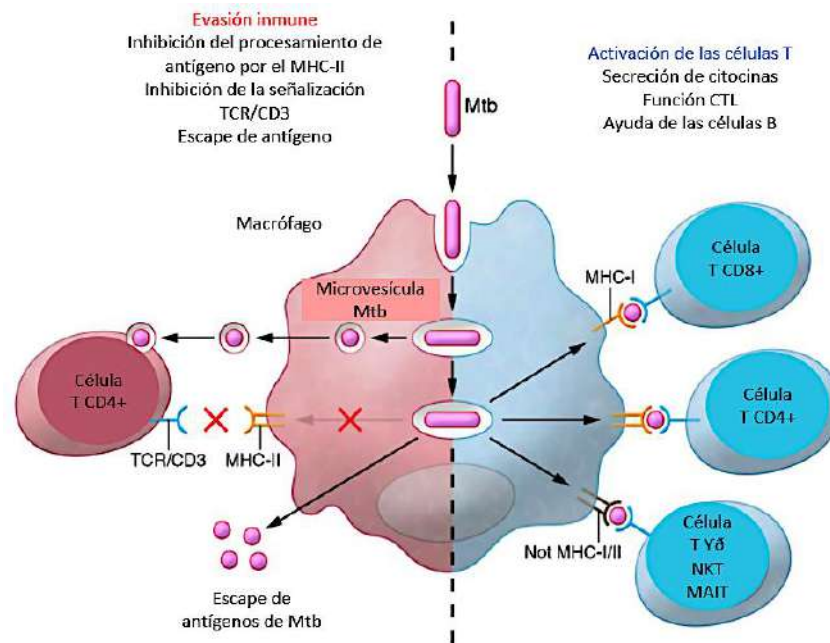


Figura 4. Evasión del reconocimiento de las células T, contra la activación de las células T por células presentadoras de antígeno infectadas por *M. tuberculosis*. Tomada y modificada (Boom et al., 2021)

La micobacteria que ha sido fagocitada por un macrófago reside en el fagosoma. En donde puede haber la liberación de microvesículas bacterianas que permiten que los productos micobacterianos, tales como lípidos, proteínas y glicolípidos como el lipoarabinomanano (LAM), lleguen a las células T CD4⁺ en la proximidad de las células infectadas (Athman et al., 2015; Prados-Rosales et al., 2011; Sande et al., 2016). La exposición que sufren las células T CD4⁺ al LAM o a microvesículas que contienen

este glicolípido, inhiben la señalización por medio del receptor CD3 de estas células, induciendo a GRAIL (anergia regulada por genes en los linfocitos), lo que provoca que las células T CD4⁺ expuestas a LAM se vuelvan anérgicas o en cierto sentido, inactivas a provocar alguna respuesta (Athman et al., 2017).

Existen mecanismos similares que ocurren en las células T CD8⁺ y en las células T DURTs, ya que estas también dependen del receptor CD3 para su activación.

2.10 Anticuerpos y las células B en la enfermedad por tuberculosis en el estado latente

Los anticuerpos pueden contribuir al control de *Mycobacterium tuberculosis* en el estado latente de la (Kawahara et al., 2019; Li & Javid, 2018; Tran et al., 2019). Las inmunoglobulinas G (IgG) presentes en el suero de pacientes expuestos o infectados de manera latente con *M. tuberculosis* pueden proteger contra el bacilo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Li et al., 2017; Lu et al., 2016). Los individuos que son resistentes a una infección por el bacilo, albergan inmunoglobulinas M (IgM) contra las proteínas ESAT6 y CFP10, y otros antígenos contra *M. tuberculosis*, así como también tienen respuestas de anticuerpos IgG de cambio de clase (Lu et al., 2019). Sin embargo, existen muy pocos estudios que sustenten el rol protector de los anticuerpos anti *M. tuberculosis* de pacientes con la enfermedad (O'Shea et al., 2018).

Los anticuerpos pueden unirse a la superficie de la micobacteria e interactuar con los receptores Fc sobre los fagocitos, lo que provoca la activación del complemento e incluso previene la adhesión bacteriana y la subsecuente invasión de las células del hospedador (Chen et al., 2020). Sin embargo, las subclases o los isotipos y los perfiles de glicosilación de los Fc pueden mediar el tipo respuesta inmune a montar (Lu et al., 2016). A través de los receptores Fc γ , se ha observado que los IgG policlonales específicos de antígeno único y múltiple en respuesta a micobacterias provenientes de personas asintomáticas expuestas e infectadas con *M. tuberculosis* puede mejorar la fagocitosis y la inhibición del crecimiento del bacilo, así como también se ha observado que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos se ve potenciada (Chen et al., 2020; Lu et al., 2016, p. 20, 2019).

2.11 Inmunoproteómica de la tuberculosis

El cuerpo humano libera proteínas asociadas a la tuberculosis en el torrente sanguíneo a través de diferentes vías de señalización cuando se encuentra infectado con *M. tuberculosis*, estas varían en concentración y se liberan bajo diferentes estados de severidad de la enfermedad (Van Altena et al., 2011). Es por esto que existen estudios donde se han evaluado antígenos y proteínas liberadas que puedan usarse como potenciales biomarcadores de LTBI, dichas moléculas se han evaluado de diversas maneras. En estudios previos se han reportado que la expresión de ciertas proteínas, tales como la peroxiredoxina 1 y la miocina de cadena pesada 9, en muestras de sueros obtenidas de pacientes con ATB o con LTBI, fueron diferentes cuando las compararon con pacientes (Zhang et al., 2014). Hay estudios reportados donde para caracterizar biomarcadores específicos y poder diferenciar la severidad de los estados de la enfermedad, se usaron técnicas de proteómica para poder evaluar distintas proteínas en diferentes estados de tuberculosis, y se encontraron expresadas proteínas como la ORM2, S100A9, IL-36 α , las cuales se ven involucradas en diversos procesos pato-fisiológicos de tuberculosis pulmonar severa, mismos que si se usan en conjunto pueden usarse como biomarcadores de TB severa, teniendo una sensibilidad reportada de 90.0% y una especificidad del 92.16% (Liu et al., 2017). La proteína ORM2 es un precursor de la glicoproteína ácida α -2, y se le denomina como una proteína indispensable en la fase aguda de la enfermedad, tiene un rol importante en la inflamación, en la supresión inmune mediada por células y también potencia el crecimiento del bacilo, promoviendo la progresión de la enfermedad. Dicha proteína se produce principalmente por los macrófagos alveolares y neumocitos tipo II en la primera fase de la tuberculosis pulmonar, también la producen los macrófagos espumosos localizados en áreas tuberculosas en estadios avanzados de la enfermedad (Martínez Cordero et al., 2008). La IL-36 α es un miembro de la familia de las interleucinas 1, que se ve incrementada en los estados de inflamación de la enfermedad, sin embargo, su función en el desarrollo de la tuberculosis aún no es clara (Ichii et al., 2017). S100A9 es una proteína de unión a calcio que se encuentra en los neutrófilos y monocitos, que también se considera una molécula de patrón

molecular asociado a daño. Dicha proteína se ve incrementada en su expresión en pacientes con tuberculosis, y puede tener un rol patológico mayor en la enfermedad, ya que regula la acumulación de los neutrófilos y la inflamación. También se ha observado que su expresión se ve incrementada cuando hay inflamación e hipoxia severa, sugiriendo una asociación entre esta molécula y la hipoxemia (Gopal et al., 2013; Kuipers et al., 2013). La proteína SOD1 es una enzima superóxido dismutasa, tiene la función de proteger a las células de la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, catalizando la dismutación del anión superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno, y también inhibe la inflamación previniendo la fragmentación oxidativa del hialuronano (Gao et al., 2008; Strålin et al., 1995). La TB es asociada con el estrés oxidativo y se ha observado la inducción de los antioxidantes del hospedero para contrarrestar esta respuesta. Se ha reportado que la expresión de dicha enzima es más baja en pacientes que presentan TB cuando se le compara con individuos sanos, así como también baja en concentración en pacientes que ya presentan falla pulmonar (Bouhafs & Jarstrand, 1999; Golubovic et al., 2010). Existen autores que reportan que SOD1 puede tener una actividad protectora contra la enfermedad, ya que esta proteína tiene como rol principal mantener el balance entre oxidación y antioxidación, lo que a su vez inhibe el proceso de inflamación (Gao et al., 2008). En un estudio realizado por el Instituto de Investigación de Tumores Torácicos y Tuberculosis en Beijing, se evaluaron 4,262 antígenos, por medio de microarreglos proteómicos. Observaron que los niveles de 152 anticuerpos IgG específicos de antígenos de *M. tuberculosis* fueron más altos en los grupos pertenecientes a tuberculosis activa, que en el grupo de LTBI. De estos, evaluaron 11 antígenos para poder observar si estos podían utilizarse para diferenciar entre LTBI y ATB, sin embargo, sus resultados no fueron estadísticamente significativos (Shu Hui Cao et al., 2018). Existen estudios donde el objetivo principal es identificar proteínas en plasma de pacientes que tienen tuberculosis en diferentes etapas y que puedan ser potenciales biomarcadores y así poder discriminar entre PTB y LTBI. En este estudio identificaron 31 proteínas expresadas diferencialmente entre pacientes que tenían PTB comparados con los pacientes con LTBI y los individuos sanos. Los resultados sugieren un modelo de diagnóstico diferencial utilizando tres proteínas de las 31 encontradas, tales como la alfa-1 antitripsina (ACT), la alfa-1 ácido glicoproteína 1 (AGP1), y la e-cadherina

(CDH1). Además, se muestra que, dicho modelo diagnóstico posee una sensibilidad del 81.2%, y una especificidad del 95.2% para discriminar entre una PTB de una LTBI (Sun et al., 2018).

Entre otros estudios, también se han caracterizado los cambios en el perfil proteómico de un cultivo de *M. tuberculosis* en estado de dormancia de 1 año. Se reportó que el perfil proteico de este cultivo era diferente de un cultivo que presentaba un metabolismo activo, pero similar a un cultivo de TB que llevaba en estado de dormancia durante 4 meses. Encontraron que en el proteoma de *M. tuberculosis* se expresaban enzimas involucradas en protección del estrés oxidativo, chaperonas, y proteínas de estabilización del DNA, así como también enzimas involucradas en vías como el ciclo acortado del TCA, procesos degradativos, y reacciones glicolíticas, sugiriendo que esto provee de un bajo nivel del metabolismo (Trutneva et al., 2020).

III. HIPÓTESIS

Mycobacterium tuberculosis expresa proteínas inmunogénicas en suero de pacientes con tuberculosis en estadio latente.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Detectar proteínas de interés proteómico, de *Mycobacterium tuberculosis* con suero de pacientes con tuberculosis en estadio latente.

4.2 Específicos

Obtener proteínas totales de un cultivo *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Determinar el proteoma de *Mycobacterium tuberculosis*.

Detectar proteínas inmunogénicas con suero de pacientes con tuberculosis en estadio latente.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Preparación de las muestras

En el departamento de patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, se realizó un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* con las cepas H37Rv (cepa prototipo), cepa 1556 (obtenida de un paciente originario de Veracruz). Estas cepas se crecieron en medio Dubos-ADC, por 2 meses o hasta obtener el estadio de latencia de la bacteria. Durante este proceso se redujo el porcentaje de oxígeno suministrado al cultivo bacteriano.

5.2 Suero de pacientes

Las muestras de pacientes se obtuvieron por medio de flebotomía, siguiendo los lineamientos bioéticos y con consentimiento informado para obtener la muestra de cada paciente.

Posterior a la obtención de sangre total, los tubos vacutainer conteniendo cada muestra se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos, posteriormente el suero se alicuotó en tubos de 1.5 mL.

5.3 Controles y criterios de inclusión

Como control positivo se usó el suero de un paciente con diagnóstico de tuberculosis confirmado y comprobado por radiografía torácica.

Los criterios de inclusión fueron:

- 1.- Haber sido vacunado con la vacuna BCG.
- 2.- Ser mayor de edad.
- 3.- No tener tuberculosis activa (comprobable por la presencia de bacilos acidorresistentes, o la prueba de BAAR).
- 4.-No tener VIH o estar inmunosuprimido.

5.- Que el paciente tenga sospecha de tuberculosis.

5.4 Monitoreo de la latencia

Para poder identificar el estadio de latencia de los cultivos de *M. tuberculosis* se realizaron lecturas de la densidad óptica de los cultivos en medio Dubos marca Becton Dickinson. Se inició de un cultivo inicial de 30 mL, de los cuales el inóculo inicial fue de la cepa H37RV: 18.33×10^6 y 1556: 15.16×10^6 . Se mantuvieron a 37°C en agitación constante, durante 2 semanas, con el fin de exponer a la micobacteria al medio de cultivo.

Una vez llegado a este punto, los cultivos tuvieron una apariencia turbia, con lo cual se realizó el pase a 65 mL de medio Dubos con suplemento ADC y 1 mL del cultivo inicial. Se realizaron seguimientos de curva de crecimiento, hasta que los cultivos alcanzaron un rango ente 0.4-0.5. Se tomaron 2 mL y se inocularon en 200 mL de medio Dubos-ADC.

Una vez que llegó a una densidad óptica de 0.394, se tomaron 100 mL de medio, se centrifugó a 3000 rpm/15 minutos. El pellet fue resuspendido en 200 mL de medio Dubos-ADC+ 500 µl de azul de metileno. Se selló perfectamente y se mantuvo a 37°C en agitación baja constante, hasta que el medio perdió la tonalidad azul.

5.5 Extracción de proteínas

Para extraer el total de proteínas a partir de los cultivos de las dos H37RV Y 1556 cepas de *M. tuberculosis* antes mencionadas, se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 minutos. Esto para separar el medio de cultivo del paquete bacteriano. El sobrenadante se reservó en tubos cónicos de 50 mL para su posterior procesamiento. El paquete que contenía la masa bacteriana se lavó tres veces con PBS pH 7.4 1X y se mezcló por medio de vortex.

Se realizaron 10 alícuotas por cada cepa, las cuales fueron sometidas a lisis mecánica. A cada alícuota se le adicionaron perlas de circonio y 800 µL de la mezcla

de masa bacteriana con PBS pH 7.3. Estas alícuotas se transfirieron a un homogeneizador de tejidos (Fast-Prep 24 versión 6004.3). Posteriormente se realizaron 7 pulsos, cada uno con duración de 20 segundos. Entre cada pulso, la alícuota era sometida a 2 minutos en hielo para realizar un shock térmico sobre la bacteria y así se garantizará la lisis de la bacteria. Una vez realizado este paso, se procedió a añadir 80 μ L del coctel de inhibidor de proteasas Cat. No. Ab65621 marca ABCAM.

Para evaluar proteínas que pudieran haber quedado en el sobrenadante del cultivo, este se sometió a una extracción de proteína. Se tomaron 9 mL del sobrenadante del cultivo y se le añadió 1 mL de ácido tricloroacético, se procedió a incubar a una temperatura de 4°C por 30 minutos. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 4 minutos. La pastilla obtenida se lavó con 1200 μ L de acetona pura fría, centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Esta misma pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS pH 7.4 y se alicuotó en tubos de 1.5 mL y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, repitiendo este proceso 5 veces. Una vez terminados los lavados, se resuspendio la pastilla en buffer 2D (CHAPS 4% w/v, UREA 7M, DTT 50 mM y azul de bromofenol 1%).

5.6 Purificación de proteínas de la biomasa bacteriana

La purificación de proteínas se realizó con el kit ReadyPrep™ 2-D Cleanup, Cat. No. 1632130 marca Biorad, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomó un vial de proteínas en un volumen final de 100 μ l, primero adicionamos 400 μ l del agente precipitante 1 y se mezcló bien por vortex durante 30 segundos las muestras se incubaron por 15 minutos en hielo. Después, añadimos 400 μ l de agente precipitante 2, se mezcló 30 segundos en vortex y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos a 4° C. Se colocó inmediatamente el tubo en hielo y se desechó el sobrenadante, se centrifugó como en el paso anterior. Posteriormente, se agregaron 40 μ l del agente de lavado 1, en la punta del pellet, y se centrifugó nuevamente, se retiró y desechó el sobrenadante. Después, se agregó 1 ml de reactivo de lavado 2 (enfriado a -20 ° C durante 1 hora) y 5 μ l del aditivo de lavado 2 y se incubaron a -20 ° C por 30 minutos (cada 10 minutos se agita en vortex el tubo durante 30 segundos). Después del

periodo de incubación se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. El pellet formado se dejó secar al aire libre a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos. Finalmente se suspendió la muestra en 200 μ l de buffer 2-D rehidratación (CHAPS 4% w/v, UREA 7M, DTT 50mM y azul de bromofenol 1%) y se guardó a -20°C hasta su uso.

5.7 Cuantificación por Bradford

Para determinar la cantidad de proteína en las muestras, se realizó el método colorimétrico Bradford. En micro placa de 96 pozos, se colocaron 5 μ l de la curva estándar con 7 diluciones de albúmina de suero bovino BSA BioRad Cat. No. 5000207, (0.125–2.0 mg/ml). El ensayo se realizó por duplicado, se colocaron 5 μ l de la muestra a cuantificar y 250 μ l del reactivo Bradford en cada pozo. La placa se cubrió con papel aluminio y se incubó a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la lectura se realizó con el software Microplate Manager a 595 nm.

5.8 Electroforesis SDS-PAGE en 1D

Para observar y determinar la integridad de proteínas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) por sus siglas en inglés. El gel separador se preparó al 12% (1.6 ml de agua destilada, 2.0 ml Acrilamida 30%, 1.3 ml Tris 1,5 M pH 8,8, 0.05 ml SDS 10%, 0.05 ml persulfato de amonio 10% y 5 μ L TEMED) y el concentrador al 5% (1.4 ml agua destilada, 0.33 ml acrilamida 30%, 0.25 ml Tris 1.0 M pH 6,8, 0.2 ml SDS 10%, 0.2 ml persulfato de amonio 10% y 4 μ l TEMED). Se cargaron 7 μ l de la muestra que contenía 10 μ g de proteína con 7 μ l de buffer de carga Laemmli x1 y 3 μ l del marcador de peso molecular de 116 kDa - 14.4 kDa (Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein MW Marker 26610 Cat. No. 11882114).

La electroforesis se realizó a 100 V durante 120 minutos, usando buffer de corrida x1 pH 8.3 (Tris-base 24 mM, SDS 0.1%, Glicina 192 mM). Una vez terminada la electroforesis, los geles se enjuagaron con agua destilada y se fijaron con solución de fijado (50% de metanol y 7% de ácido acético glacial) por 30 minutos, después se tiñeron con sypro ruby (Invitrogen Cat. No. S12001) durante 30 min en agitación, calentándolos al microondas en intervalos de 30 segundos y 5 minutos y se destiñeron con una solución de desteñido (metanol 10%, ácido acético glacial 7%), por 30 minutos en agitación, después se lavaron dos veces por 5 minutos con agua destilada estéril. Los geles se visualizaron en el fotodocumentador UV de BioRad y se analizaron con el programa Image Lab.

5.9 Transferencia a membrana de nitrocelulosa, Western Blot y revelado de membrana

La transferencia de uno de los geles SDS-PAGE se llevó a cabo en cámara semi seca (Biorad®) y se corrió a 15 V por 20 minutos. En el centro se colocó papel filtro humedecido con buffer de transferencia x1 (Tris- base 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%), se colocó al centro de la cámara un papel filtro, la membrana de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0.45 μ M, el gel y un segundo papel filtro.

Posteriormente, se realizó el bloqueo de la membrana con leche descremada al 5% preparada con PBS 1x pH 7.4, incubado en agitación lenta a 4°C durante toda la noche (O.N), al día siguiente se realizaron dos lavados rápidos de la membrana con PBS pH 7.4 y un tercero en agitación por 15 minutos. Se realizó una solución de PBS y leche descremada al 0.1% para elaborar una dilución 1:100 de suero del paciente con tuberculosis latente. La membrana se montó en una bolsa de plástico junto con la solución del suero, se selló herméticamente, y se incubó a temperatura ambiente toda la noche en agitación lenta y constante. Al siguiente día se realizaron cinco lavados con PBS-Tween al 0.1% de 5 minutos cada uno. Se realizó una dilución 1:3000 de anticuerpo secundario anti-humano IgG acoplado a HRP (Jackson IR Cat. No. 109-035-003), con una solución de PBS y leche descremada al 0.1%, y se incubó la membrana con esta solución por 1 h en agitación constante. Después se lavó la

membrana diez veces con PBS-Tween al 0.1% comenzando con tres lavados de 10 minutos cada uno, y posteriormente siete lavados de 5 minutos cada uno. El revelado de la membrana se realizó por quimioluminiscencia.

5.10 Identificación del proteoma de *M. tuberculosis*

A partir de los extractos de proteínas obtenidos, se mandó a analizar una fracción de la misma a espectrometría de masas tipo shot gun, a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), perteneciente a la Universidad Autónoma de México.

Dichos extractos fueron hidrolizados por medio de una digestión con tripsina, añadiendo 30 μ l de solución de tripsina porcina modificada a 20 ng/ μ l marca Promega en 0.05 mol/L de bicarbonato de amonio, seguido de una incubación durante 24 horas a 37°C.

Los péptidos obtenidos se extrajeron dos veces en acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido fórmico al 5% (v/v) durante 30 minutos con sonicación. El volumen obtenido se disminuyó mediante evaporación en una centrífuga al vacío y se ajustó a 20 μ l con ácido fórmico al 1% (v/v). El análisis de espectrometría de masas de los péptidos se llevó a cabo usando un sistema integrado nanoLC-ESI MS/MS cuádruple/tiempo de luz, espectrómetro de masas de alta definición synapt G2 (Waters Corporation) equipado con una fuente de iones NanoLockSpray. El instrumento se conectó en línea a una cromatografía líquida NanoAcquity Ultra-Performance (UPLC; Waters Corporation). Se utilizó un sistema de solventes binarios el cual se constituía de dos fases móviles, en donde la fase A contenía 2% de acitronil en agua Milli Q con 0.1% de ácido fórmico, y la fase B contenía 98% de acitronil en agua Milli Q con 0.1% de ácido fórmico en una columna de captura simétrica UPLC C18 (5 mm, 180mm x 20 mm; Waters Corporation). Las muestras fueron desaladas, concentradas y lavadas con el 100% de la fase móvil "A" a una tasa de flujo de 15 μ l/min. Después, dentro de 3 minutos, la columna de captura se cambió de línea a una columna analítica. Los péptidos se separaron en una columna UPLC BEH, C18 (1.7 mm, 75 mm x 100 mm; Waters Corporation) con el uso de un gradiente lineal de 40% B sobre un periodo de 30 minutos a una tasa de flujo de 0.3 μ l/min, seguido de un 98% de fase móvil B. El

procesamiento de los datos se realizó usando software PLGS (Protein Lynx Global Server, versión 2.5.3, ©Waters) Se utilizó un puntaje PLGS con un intervalo de confianza >95%. Se usó como base de datos mundial sobre el genotipado de *M. tuberculosis* (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr>) para la identificación de los péptidos con los péptidos teóricos de proteínas reportadas de *M. tuberculosis*.

Los datos obtenidos se compararon con los pesos moleculares obtenidos por los inmunoensayos de Western Blot para así identificar las proteínas inmunodetectadas. También se realizó una identificación teórica basada en la búsqueda bibliográfica de las proteínas identificadas como posibles candidatas para biomarcador.

5.11 Disposición de desechos

Todo material punzocortante utilizado para la flebotomía será separado de acuerdo al punto 6.2.1 de la NOM-087 donde establece que este tipo de material deberá ser envasado en un recipiente rígido de polipropileno, resistente a fracturas, de color rojo.

Los cultivos que se realizarán en este proyecto serán dispuestos de acuerdo al punto 6.2.1 de la NOM-087, donde indica que estos deberán ser desechados en una bolsa de plástico rojo, previamente inactivada la bacteria. Así como también los geles que contengan los sueros de los pacientes.

También se seguirán las medidas de llenado que indica la norma en el punto 6.2.1.2 donde se llenarán al 80% de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento colocándole la leyenda de “PELIGRO, RESIDUOS PELIGROSOS SÓLIDOS BIOLÓGICO-INFECIOSOS” y también se marcarán con el símbolo universal de riesgo biológico.

Los tubos Vacutainer conteniendo la sangre total de los pacientes serán almacenados para su desecho, según el punto 6.4 de la norma donde se indica que se deberá asignar un área de almacenamiento de estos residuos, a una temperatura no mayor a los 4°C según el punto 6.4.3.4. Después se contendrán en bolsas rojas para su posterior disposición final.

VI. RESULTADOS

6.1 Confirmación de la fase latente

Una vez obtenidos los cultivos, estos se analizaron conforme a su crecimiento, detectando la fase de latencia. La fase exponencial se detectó en una D.O de 0.402 para la cepa H37RV y la cepa 1556 a una D.O de 0.519. Misma fase se detectó por medio de las lecturas de densidad óptica. La fase de latencia pudo confirmarse a partir de la densidad óptica de 0.613 para la cepa H37RV, la cual se mantuvo desde el día 12 hasta el día 22. Mientras que para la cepa 1556 la latencia se pudo corroborar con una densidad óptica de 0.311 a partir del día 21 y se mantuvo hasta el día 32 (Figura 5).

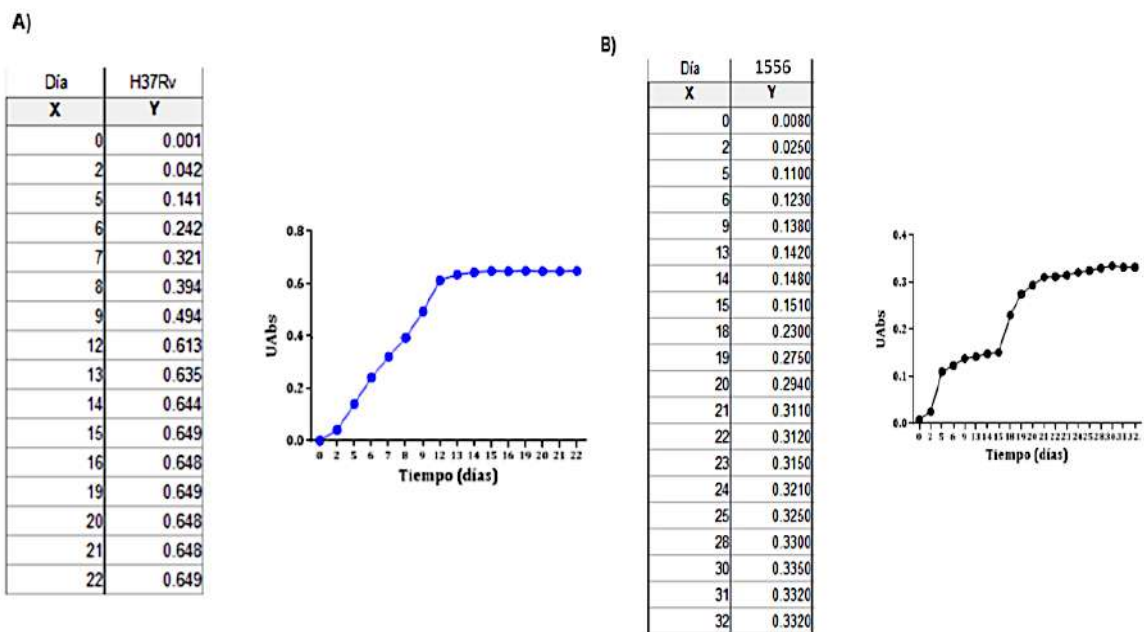


Figura 5. Curvas de crecimiento de *M. tuberculosis*. A) Patrón de crecimiento de la cepa H37RV. B) Patrón de crecimiento de la cepa 1556.

6.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Posterior a la extracción de proteínas de las 2 cepas de *M. tuberculosis* se realizó la cuantificación por el método colorimétrico de Bradford. Para determinar la

concentración de proteínas en las muestras extraídas previamente, se realizó una curva de calibración usando BSA con los estándares de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL; cuantificados por triplicado, la curva arrojó un valor de $R^2 = 0.9336$ (Figura 6).

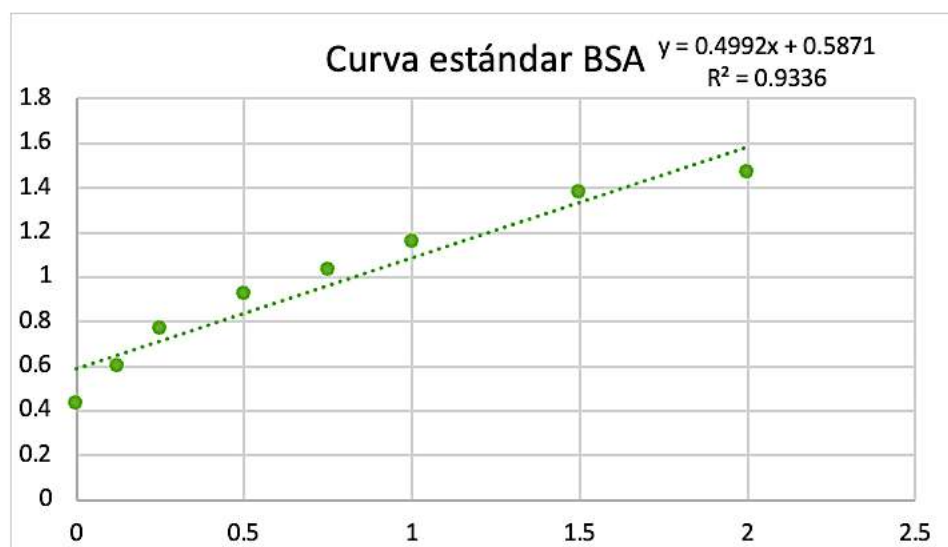


Figura 6. Regresión lineal para la cuantificación de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*, cepas H37RV y 1556.

En el cuadro 1 se muestran los resultados de absorbancia para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras de *M. tuberculosis* H37RV y 1556 respectivamente, según la ecuación $x=(y-b)/m$. La concentración de las muestras fue de 0.175 mg/mL y 0.982 mg/ mL respectivamente, posteriormente se calculó la concentración que había por muestra en microgramos por microlitro para saber la concentración exacta de cada vial. Esto para determinar si la cantidad es suficiente para realizar ensayos posteriores, tales como los ensayos de integridad proteica, western blot y el análisis del proteoma.

Cuadro 1. Concentración de las muestras de proteínas.

Muestra	Absorbancia 595nm	Concentración mg/mL	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
H37RV	0.6749	0.17589	35.16
1556	1.0775	0.9825	196.4

De ambas muestras analizadas, se puede observar que ambas poseen una cantidad suficiente para poder realizar los análisis de integridad de proteína y los ensayos de western blot para poder detectar a las proteínas inmunogénicas y analizar el proteoma general de *M. tuberculosis* en estado de latencia (Cuadro 1).

6.3 Integridad de proteínas

Una vez realizada la cuantificación, se realizó un análisis de integridad de las proteínas totales de *M. tuberculosis* en estado de latencia por medio de una electroforesis en 1D SDS-PAGE al 12%. De acuerdo a la cuantificación previa, se añadieron 8 μL de muestra a cada pozo, en la cual había una concentración de proteína de 10 μg totales, misma que después de teñir con Sypro Ruby (Invitrogen) y analizar por medio del fotodocumentador (Bio Rad), se observaron diferentes bandas de proteínas de distintos pesos moleculares, y una integridad óptima para realizar la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa y posteriormente analizarlas por medio de los ensayos de Western Blot.

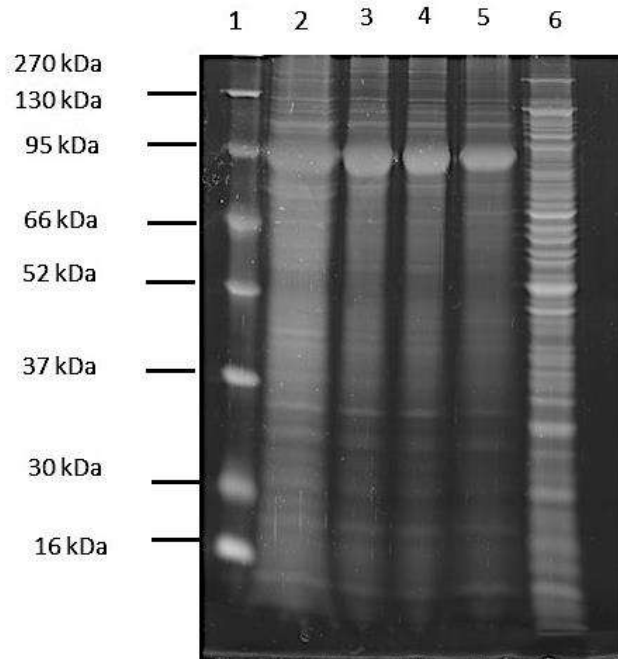


Figura 7. Análisis de integridad de las proteínas extraídas. Carriles: 1) marcador de peso molecular en kDa; 2 y 5) perfil proteico de la cepa H37RV; 3 y 4) Perfil proteico de la cepa 1556; 6) control positivo, perfil proteico de *E. coli* TOP1.

6.4 Inmunodetección de las proteínas por medio del suero de los pacientes

Para poder inmunodetectar a las proteínas inmunogénicas, se utilizaron los sueros de pacientes con tuberculosis tanto latente como activa, se realizó un ensayo de inmunodetección. El resultado mostró la presencia de proteínas inmunorreactivas unidas al anticuerpo secundario (Figura 8). Sin embargo, se puede hacer la distinción que existe un perfil proteico distinto entre el suero del paciente con tuberculosis activa y el suero del paciente con tuberculosis latente. Se puede observar que, en la membrana correspondiente al paciente que presenta tuberculosis activa, ya que se observaron proteínas de 66 kDa, 52 kDa, y 51 kDa (señaladas con flechas azules). Mientras que en la membrana que interaccionó con el suero de un paciente con tuberculosis latente, se observaron proteínas desde los 94 kDa, 64 kDa, 63 kDa, 62 kDa, 50 kDa, 40 kDa y 35 kDa, respectivamente (señaladas con flechas azules en la Figura 8). También se puede observar que, en la membrana que fue incubada con el

suero del paciente con tuberculosis activa, el inmunorreconocimiento de proteínas en ambas cepas. Mientras que, en la membrana tratada con el suero del paciente con tuberculosis latente, solo hubo reconocimiento en la cepa H37RV (Figura 8).

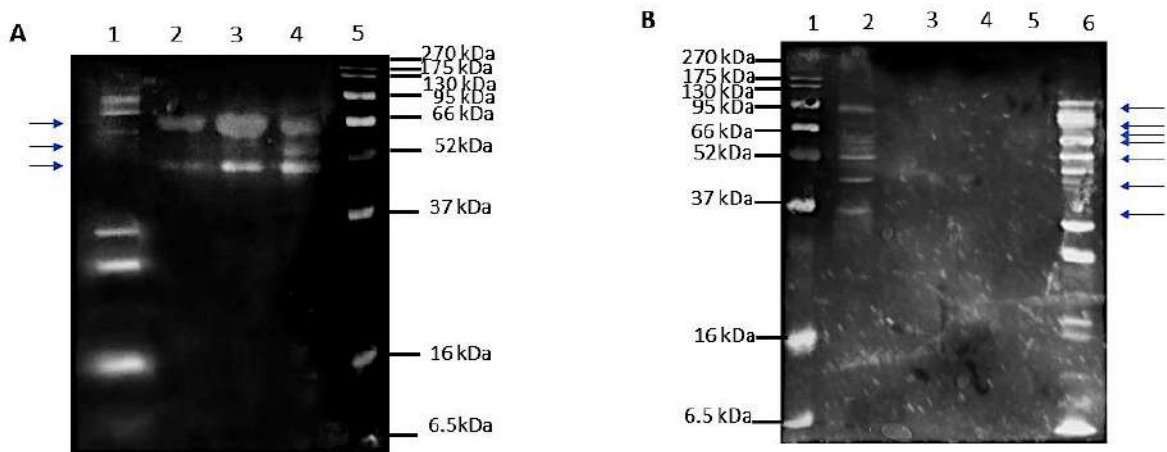


Figura 8. Detección de proteínas inmunogénicas con el suero de pacientes en diferentes tipos de infección con tuberculosis.

En la Figura 8 podemos se muestra en el panel A, la membrana tratada con el suero del paciente con tuberculosis activa, en donde el carril 1 pertenece al control positivo que es *E. coli* TOP 10; Carril 2: Cepa H37RVH; Carril 3: Cepa 1556; Carril 4: H37RV; Carril 5: marcador de peso molecular. En el panel B se puede observar la membrana tratada con el suero de un paciente con tuberculosis latente, donde el Carril 1 es el marcador de peso molecular; Carril 2: Cepa H37RV; Carril 3: Cepa 1556; Carril 4: 1556; Carril 5: H37RVH; Carril 6: control positivo *E. coli* TOP10.

6.5 Identificación del proteoma de *M. tuberculosis*

Una vez obtenidos los extractos proteicos de ambas cepas de *M. tuberculosis*, se procedió a identificar a las proteínas del bacilo. Cada muestra fue procesada por

medio de espectrometría de masas tipo shot gun, donde se identificaron proteínas con diversas funciones (**ver Cuadro 2**).

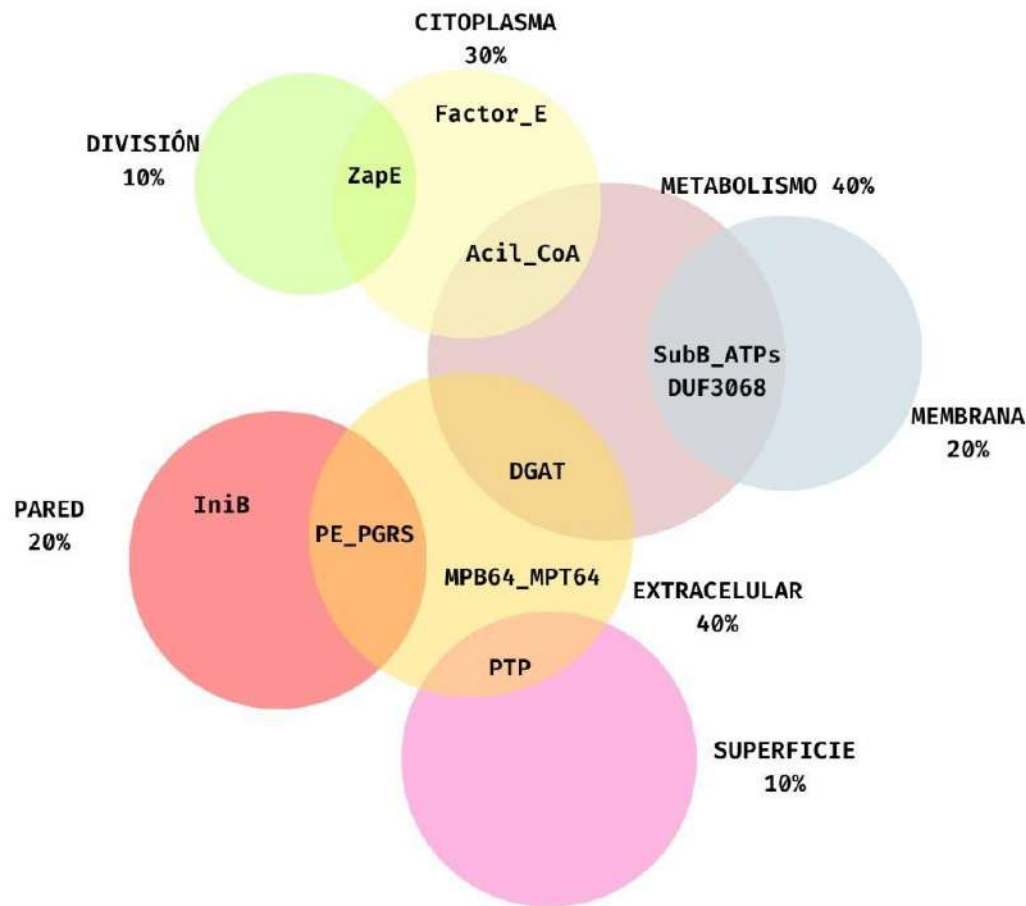


Figura 9. Diagrama de Venn en donde se muestran los grupos de proteínas identificadas por medio de la espectrometría de masas tipo shot gun, pertenecientes a *M. tuberculosis*.

Los resultados mostraron que se identificaron proteínas extracelulares de: a) superficie., b) pared., c) membrana y d) citoplasma. Así como también se identificaron proteínas que se ven involucradas en el metabolismo, y división celular. La mayor cantidad de proteínas encontradas, con un porcentaje de ~ 40%, fueron proteínas involucradas en el metabolismo del bacilo, seguido en abundancia de proteínas de citoplasma con un porcentaje de ~ 30%, ~ 20% de abundancia de proteínas de pared celular y membrana, así como también ~ 10% de proteínas pertenecientes a la superficie.

Cuadro 2. Resultados de las proteínas identificadas por espectrometría de masas tipo shot gun.

Proteína	Código de acceso	Peso molecular (Da)	Punto isoelectrico	PLGS Score
iniB OS proteina inducible por isoniazida <i>M. tuberculosis</i>	A0A0451RQ4_MYCTX	43894	5.16	3410.463
Factor de elongación Tu <i>M. tuberculosis</i>	EFTU_MYCTU	43566	5.124	840.7891
Proteína sin caracterizar <i>Mycobacterium chitae</i>	A0A3S4RBA6_MYCCI	4677	4.6714	566.4104
Proteína inmunogénica MPB64 MPT64 <i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	A0A100XHF9_MYCTH	25178	4.0752	228.0202
Proteína perteneciente a la familia PE PGRS de <i>M. tuberculosis</i>	Q8VKN3_MYCTO	52715	5.3247	199.3678
Deshidrogenasa acil CoA <i>M. novum</i>	A0A717JL29_9MYCO	77580	4.7241	190.8741
Subunidad beta de ATP sintasa <i>M. sherrisii</i>	A0A1E3T5R8_9MYCO	52829	4.6377	177.2839
Proteína contenida en el dominio DUF3068 <i>M. grossiae</i>	A0A1E8PZD0_9MYCO	43744	4.3755	166.912
Diacilglicerol aciltransferasa mycoliltransferas a Ag85A <i>M. conspicuum</i>	A0A1X1TJX6_9MYCO	35977	7.1455	132.5137
Proteína ZapE de división celular <i>M. intermedium</i>	A0A1E3SE47_MYCIE	38293	5.1211	104.4478
Peptidasa tripeptidil proil <i>Mycobacteroides salmoniphulim</i>	A0A4R8SWM9_9MYCO	69142	4.7314	87.5602

VII. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en este trabajo sugieren que el sistema inmunológico del huésped es capaz de detectar y responder a proteínas inmunogénicas de *M.*

tuberculosis, lo que podría ser un indicativo de la capacidad del sistema inmunológico para mantener la infección controlada. El hecho de que las proteínas de *M. tuberculosis* sean inmunorreconocidas por los sueros de pacientes con tuberculosis latente sugiere una respuesta inmunológica activa a la infección por *M. tuberculosis*, incluso en casos de tuberculosis latente. Esto es importante, ya que la tuberculosis latente se caracteriza por la presencia del microorganismo en el cuerpo sin manifestar síntomas clínicos. Trabajos previos para identificar a la población con tuberculosis latente, misma que funciona como reservorio de la enfermedad, se identificaron proteínas como la ORM2, S100A9, y la IL-36 α que pueden detectar una TB severa, con una sensibilidad reportada de 90% y una especificidad del 92.16%. Sin embargo, no son específicas de LTBI y la función de la proteína IL-36 α en el desarrollo de la enfermedad aún no está clara (Liu et al., 2017; Ichii et al., 2017). Adicionalmente, existen reportes de trabajos realizados por ensayos con microarreglos y proteómica, en donde se han sugerido a las proteínas ACT, AGP1 y CDH1, los cuales, si se utilizan en conjunto, pueden diferenciar entre una PTB y una LTBI con una sensibilidad de 81.2% y una especificidad del 95.2%. Sin embargo, hace falta evaluar su aplicación en la población mexicana y los porcentajes de sensibilidad y especificidad son semejantes a los reportados en la prueba T-SPOT TB (Flores-Ibarra et al., 2015; Sun et al., 2018).

Una vez obtenidos los resultados del proteoma de *M. tuberculosis* por medio de la espectrometría de masas y ensayos de inmunodetección se logró la identificación de proteínas que fueron reconocidas por el suero de un paciente que presentaba tuberculosis en fase latente en una manera diferencial a las detectadas por el suero de un paciente con tuberculosis activa. Estos resultados son consistentes con los reportados en una investigación realizada para analizar la expresión de diferentes proteínas en el estado de dormancia del bacilo, en donde se comparó un cultivo de 1 año en estado de latencia, con un cultivo con tuberculosis en fase activa. Se encontraron expresadas enzimas pertenecientes a vías metabólicas. Sin embargo, las proteínas que se encontraron con mayor expresión en el estado de dormancia fueron enzimas involucradas en procesos de protección celular contra el estrés oxidativo tales como la superóxido dismutasa, catalasas y peroxidases. Y también proteínas de unión al DNA (hupB/Rv2986. iniB/Rv0341) , las cuales se cree que pueden servir

al bacilo para la estabilización del material genético durante los estados largos de dormancia (Trutneva et al., 2020), mismas proteínas que podemos ver expresadas en este estudio (Ver Cuadro 2).

Según sus características fisicoquímicas, se identificó a una proteína de 52.71 kDa y un punto isoeléctrico de 5.3 (ver Figura 8, Cuadro 2), perteneciente a la familia de proteínas PE-PGRS, las cuales están involucradas en la supervivencia del microorganismo a ambientes hostiles, cuyos genes se expresan en condiciones de bajo pH y cuando existe una baja de nutrientes importante (De Maio et al., 2020; Dheenadhayalan et al., 2006; Giovanni Delogu et al., 2004), esto es coherente con la capacidad que posee el patógeno para persistir en el huésped durante periodos prolongados, en donde es necesario la adaptación del bacilo en ambientes hostiles. Estas proteínas se encuentran localizadas principalmente en la pared celular de Mtb, en la membrana celular y en el periplasma (Brennan et al., 2001; De Maio et al., 2014; Sayera Banu et al., 2002) y también son secretadas en una manera dependiente del sistema ESX5 (Ates et al., 2018) y además se ha demostrado su capacidad de modular las respuestas inflamatorias anti-micobacterianas, su participación en metabolismo de lípidos, muerte celular, autofagia e incluso inhibir la maduración del lisosoma en los macrófagos, así como también son de vital importancia en la virulencia del bacilo (Xie et al., 2021). La presencia de esta familia de proteínas solo en cepas del género mycobacterium, tal es el caso de *M. marinum*, *M. bovis* y *M. tuberculosis* también habla de su importancia en la patogénesis de la enfermedad (Sampson, 2011).

También se identificó a la proteína diacilglicerol acetiltransferasa Ag85A que, entre sus características fisicoquímicas, tiene un peso molecular de 35.97 kDa y un punto isoeléctrico de 7.14 (Ver Figura 8, Cuadro 2). Dicha proteína pertenece al complejo antigénico 85, el cual constituye el 60% del secretoma micobacteriano y consiste en tres proteínas con actividad enzimática, las cuales son secretadas abundantemente (FbpA, FbpB y FbpC2), estas juegan un rol crucial en la patogénesis de la tuberculosis y también poseen una actividad micoliltransferasa en la pared celular, donde ayuda a la unión del ácido micólico con el arabinogalactano (Kremer et al., 2002). Las enzimas de este complejo sintetizan el glicolípido más abundante de la célula micobacteriana,

el dimicolato trehalosa (o también conocido como el factor cuerda), el cual es esencial para la integridad de la pared celular del bacilo y su patogénesis (Nguyen et al., 2005). Tienen un papel fundamental en la virulencia de Mtb, ya que es requerido para su supervivencia intracelular dentro de los macrófagos, promueve respuestas inmunes, así como también inhibe la maduración del fagosoma (Kumar et al., 2010; Kuo et al., 2012). Mtb acumula grandes cantidades de triacilglicerol durante la hipoxia, mismo que actúa como almacenamiento de energía y carbono. Este triacilglicerol se guarda en formas intracelulares, como gotas de lípidos, que son esenciales para la supervivencia del bacilo en un estado de dormancia, y se ha demostrado que Ag85A puede jugar un papel significativo en la formación de estos cuerpos de almacenamiento, implicando a esta enzima en la persistencia de la infección por tuberculosis (Daniel et al., 2011; Elamin et al., 2011; Garton et al., 2002).

Es importante mencionar que *Mycobacterium tuberculosis* puede quedar inactivo en el huésped durante meses, incluso años si producir enfermedad y luego activarse e iniciar la producción de lesiones y sintomatología contagiosa. El estado de latencia que desarrolla el bacilo puede durar años en el huésped a su vez se ha demostrado que en este estado inactivo la micobacteria desarrolla resistencia a los antibióticos de primera línea tales como la isoniazida y la rifampicina (Wayne & Sramek, 1994), por lo que es necesario detectar esta fase de manera sensible y específica. Los antígenos bacterianos, pueden ser usados para métodos de diagnóstico ya que son altamente inmunogénicos, e incluso pueden ser secretados en el medio extracelular (Hong et al., 2011), lo que los hace grandes candidatos para poder hacer un diagnóstico diferencial de tuberculosis.

En general, estos resultados respaldan la idea de que la tuberculosis latente es un estado activo de inmunorreconocimiento, y las proteínas identificadas podrían ser objetivos importantes tanto para comprender mejor la patogénesis de la tuberculosis latente, así como también su potencial para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico. Además, estos hallazgos subrayan la importancia de la investigación continua en el campo de la tuberculosis para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad.

VIII. CONCLUSIÓN

En esta investigación se logró la detección de proteínas inmunogénicas *M. tuberculosis*. El suero del paciente diagnosticado en fase de latencia reconoce proteínas expresadas del bacilo en estado de dormancia, por lo que se pudieron identificar y clasificar a dichas proteínas según su peso molecular y punto isoeléctrico, acorde a los resultados de espectrometría de masas y los ensayos de inmunodetección. Posterior a un análisis bibliográfico, se encontró que existen dos familias de proteínas que pueden utilizarse como potenciales biomarcadores de la latencia, tales como las proteínas pertenecientes a la subfamilia PE-PGRS, y al complejo antigénico 85. Ambas familias se han reportado que pueden ser secretadas y que también están localizadas en la membrana del bacilo. Sin embargo, también han reportado funciones en la inmunorregulación para asegurar la supervivencia del bacilo en ambientes hostiles, ambientes presentados una vez que se fagocitan por los macrófagos, los cuales son principalmente baja de nutrientes, bajo pH, e hipoxia, además de participar en la patogenicidad del microorganismo, y tener un rol activo en la latencia de la enfermedad, por lo que podrían ser propuestas para el desarrollo de nuevas técnicas de detección que sean capaces de diferenciar entre una fase latente y una fase activa de la enfermedad, contribuyendo al control de la diseminación y transmisión de la tuberculosis.

IX. REFERENCIAS

AlMatar, M., Makky, E. A., Yakıcı, G., Var, I., Kayar, B., & Köksal, F. (2018).

Antimicrobial peptides as an alternative to anti-tuberculosis drugs.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.011>

Alvarez-Jiménez, V. D., Leyva-Paredes, K., García-Martínez, M., Vázquez-Flores, L., García-Paredes, V. G., Campillo-Navarro, M., Romo-Cruz, I., Rosales-García, V. H., Castañeda-Casimiro, J., González-Pozos, S., Manuel Hernández, J., Wong-Baeza, C., García-Pérez, B. E., Ortiz-Navarrete, V., Estrada-Parra, S., Serafín-López, J., Wong-Baeza, I., Chacón-Salinas, R., & Estrada-García, I. (2018). Extracellular vesicles released from *Mycobacterium tuberculosis*-Infected neutrophils promote macrophage autophagy and decrease intracellular mycobacterial survival. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00272>

Arcos, J., Diangelo, L. E., Scordo, J. M., Sasindran, S. J., Moliva, J. I., Turner, J., & Torrelles, J. B. (2015). Lung Mucosa Lining Fluid Modification of *Mycobacterium tuberculosis* to Reprogram Human Neutrophil Killing Mechanisms. *Journal of Infectious Diseases*, 212(6), 948–958. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv146>

Arcos, J., Sasindran, S. J., Fujiwara, N., Turner, J., Schlesinger, L. S., & Torrelles, J. B. (2011). Human Lung Hydrolases Delineate *Mycobacterium tuberculosis* – Macrophage Interactions and the Capacity To Control Infection . *The Journal of Immunology*, 187(1), 372–381. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100823>

Ardain, A., Domingo-Gonzalez, R., Das, S., Kazer, S. W., Howard, N. C., Singh, A., Ahmed, M., Nhamoyebonde, S., Rangel-Moreno, J., Ogongo, P., Lu, L., Ramsuran, D., de la Luz Garcia-Hernandez, M., K. Ulland, T., Darby, M., Park, E., Karim, F., Melocchi, L., Madansein, R., ... Khader, S. A. (2019). Group 3

innate lymphoid cells mediate early protective immunity against tuberculosis.

Nature, 570(7762), 528–532. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1276-2>

Ates, L. S., Dippenaar, A., Ummels, R., Piersma, S. R., Van Der Woude, A. D., Van Der Kuij, K., Le Chevalier, F., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., Marquina-Castillo, B., Guapillo, C., Jiménez, C. R., Pain, A., Houben, E. N. G., Warren, R. M., Brosch, R., Hernández-Pando, R., & Bitter, W. (2018). Mutations in ppe38 block PE_PGRS secretion and increase virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Microbiology*, 3(2), 181–188. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0090-6>

Athman, J. J., Sande, O. J., Groft, S. G., Reba, S. M., Nagy, N., Wearsch, P. A., Richardson, E. T., Rojas, R., Boom, W. H., Shukla, S., & Harding, C. V. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* Membrane Vesicles Inhibit T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 198(5), 2028–2037. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601199>

Athman, J. J., Wang, Y., McDonald, D. J., Boom, W. H., Harding, C. V., & Wearsch, P. A. (2015). Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of *Mycobacterium tuberculosis* Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages. *The Journal of Immunology*, 195(3), 1044–1053. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402894>

Babu, D., Morgan, A. G., Reiz, B., Whittal, R. M., Almas, S., Lacy, P., & Siraki, A. G. (2019). Eosinophil peroxidase oxidizes isoniazid to form the active metabolite against *M. tuberculosis*, isoniazid-NAD⁺. *Chemico-Biological Interactions*, 305(January), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.03.019>

- Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., & Sher, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(12), 1715–1724. <https://doi.org/10.1084/jem.20051782>
- Bhatt, K., Hickman, S. P., & Salgame, P. (2004). Cutting Edge: A New Approach to Modeling Early Lung Immunity in Murine Tuberculosis. *The Journal of Immunology*, *172*(5), 2748–2751. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2748>
- Black, G. F., Thiel, B. A., Ota, M. O., Parida, S. K., Adegbola, R., Boom, W. H., Dockrell, H. M., Franken, K. L. M. C., Friggen, A. H., Hill, P. C., Klein, M. R., Lalor, M. K., Mayanja, H., Schoolnik, G., Stanley, K., Weldingh, K., Kaufmann, S. H. E., Walzl, G., & Ottenhoff, T. H. M. (2009). Immunogenicity of Novel DosR Regulon-Encoded Candidate Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in Three High-Burden Populations in Africa. *Clinical and Vaccine Immunology*, *16*(8), 1203–1212. <https://doi.org/10.1128/CVI.00111-09>
- Blomgran, R., & Ernst, J. D. (2011). Lung Neutrophils Facilitate Activation of Naive Antigen-Specific CD4 + T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection . *The Journal of Immunology*, *186*(12), 7110–7119. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100001>
- Bonecini-Almeida, M. G., Ho, J. L., Boéchat, N., Huard, R. C., Chitale, S., Doo, H., Geng, J., Rego, L., Lazzarini, L. C. O., Kritski, A. L., Johnson, W. D., McCaffrey, T. A., & Lapa E Silva, J. R. (2004). Down-Modulation of Lung Immune Responses by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor β (TGF- β) and Analysis of TGF- β Receptors I and II in Active Tuberculosis. *Infection and Immunity*, *72*(5), 2628–2634. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2628-2634.2004>

- Boom, W. H., Schaible, U. E., & Achkar, J. M. (2021). The knowns and unknowns of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Clinical Investigation*, *131*(3), e136222. <https://doi.org/10.1172/JCI136222>
- Bouhafs, R. K. L., & Jarstrand, C. (1999). Lipid Peroxidation of Lung Surfactant by Bacteria. *Lung*, *177*(2), 101–110. <https://doi.org/10.1007/PL00007629>
- Brandtzaeg, P. (2013). Secretory IgA: Designed for anti-microbial defense. *Frontiers in Immunology*, *4*(AUG), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00222>
- Brennan, M. J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M., & Jacobs, W. R. (2001). Evidence that Mycobacterial PE_PGRS Proteins Are Cell Surface Constituents That Influence Interactions with Other Cells. *Infection and Immunity*, *69*(12), 7326–7333. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7326-7333.2001>
- Cadena, A. M., Fortune, S. M., & Flynn, J. L. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, *17*(11), 691–702. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.69>
- Cardona, P. J., & Ruiz-Manzano, J. (2004). On the nature of Mycobacterium tuberculosis-latent bacilli. *European Respiratory Journal*, *24*(6), 1044–1051. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00072604>
- Carlos, D., Frantz, F. G., Souza-Júnior, D. A., Jamur, M. C., Oliver, C., Ramos, S. G., Quesniaux, V. F., Ryffel, B., Silva, C. L., Bozza, M. T., & Faccioli, L. H. (2009). TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes and Infection*, *11*(8–9), 770–778. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.025>

- Chai, Q., Lu, Z., & Liu, C. H. (2020). Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(10), 1859–1878. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03353-5>
- Chai, Q., Zhang, Y., & Liu, C. H. (2018). *Mycobacterium tuberculosis*: An adaptable pathogen associated with multiple human diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00158>
- Chegou, N. N., Black, G. F., Kidd, M., van Helden, P. D., & Walzl, G. (2009). Host markers in Quantiferon supernatants differentiate active TB from latent TB infection: Preliminary report. *BMC Pulmonary Medicine*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-9-21>
- Chen, T., Blanc, C., Liu, Y., Ishida, E., Singer, S., Xu, J., Joe, M., Jenny-Avital, E. R., Chan, J., Lowary, T. L., & Achkar, J. M. (2020). Capsular glycan recognition provides antibody-mediated immunity against tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 1808–1822. <https://doi.org/10.1172/JCI128459>
- Crapo, J. D., Barry, B. E., Gehr, P., Bachofen, M., & Weibel, E. R. (1982). Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *American Review of Respiratory Disease*, 125(6), 740–745. <https://doi.org/10.1164/arrd.1982.125.6.740>
- Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 185–189. <https://doi.org/10.1038/nri3803>
- Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D., & Kolattukudy, P. E. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded

- Macrophages. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002093.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002093>
- De Maio, F., Berisio, R., Manganelli, R., & Delogu, G. (2020). PE_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: A specialized molecular task force at the forefront of host–pathogen interaction. *Virulence*, 11(1), 898–915.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1785815>
- De Maio, F., Maulucci, G., Minerva, M., Anosseh, S., Palucci, I., Iantomasi, R., Palmieri, V., Camassa, S., Sali, M., Sanguinetti, M., Bitter, W., Manganelli, R., De Spirito, M., & Delogu, G. (2014). Impact of Protein Domains on PE_PGRS30 Polar Localization in Mycobacteria. *PLoS ONE*, 9(11), e112482.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112482>
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5(1).
<https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.070>
- Dheda, K., Barry, C. E., & Maartens, G. (2016). Tuberculosis. *The Lancet*, 387(10024), 1211–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00151-8)
- Dheenadhayalan, V., Delogu, G., Sanguinetti, M., Fadda, G., & Brennan, M. J. (2006). Variable Expression Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS Genes: Evidence that PE_PGRS16 and PE_PGRS26 Are Inversely Regulated In Vivo. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3721–3725.
<https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3721-3725.2006>
- Dye, C., Glaziou, P., Floyd, K., & Raviglione, M. (2013). Prospects for tuberculosis elimination. *Annual Review of Public Health*, 34, 271–286.
<https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114431>

- Eghtesad, M., Jackson, H. E., & Cunningham, A. C. (2001). Primary human alveolar epithelial cells can elicit the transendothelial migration of CD14⁺ monocytes and CD3⁺ lymphocytes. *Immunology*, *102*(2), 157–164.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01172.x>
- Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2011). *Against Host Stresses*. *11*(8), 1170–1178.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x>
- Elamin, A. A., Stehr, M., Spallek, R., Rohde, M., & Singh, M. (2011). The *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A is a novel diacylglycerol acyltransferase involved in lipid body formation. *Molecular Microbiology*, *81*(6), 1577–1592.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07792.x>
- Emgård, J., Kammoun, H., García-Cassani, B., Chesné, J., Parigi, S. M., Jacob, J. M., Cheng, H. W., Evren, E., Das, S., Czarnewski, P., Sleiers, N., Melo-Gonzalez, F., Kvedaraite, E., Svensson, M., Scandella, E., Hepworth, M. R., Huber, S., Ludewig, B., Peduto, L., ... Willinger, T. (2018). Oxysterol Sensing through the Receptor GPR183 Promotes the Lymphoid-Tissue-Inducing Function of Innate Lymphoid Cells and Colonic Inflammation. *Immunity*, *48*(1), 120-132.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.020>
- Ernst, J. D. (2018). Mechanisms of *M. tuberculosis* Immune Evasion as Challenges to TB Vaccine Design. *Cell Host & Microbe*, *24*(1), 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.004>
- Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F. L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G., & Campa, M. (2008). Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of

mycobacteria and other bacteria. *Infection and Immunity*, 76(4), 1719–1727.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00870-07>

Ezewudo, M., Borens, A., Chiner-Oms, Á., Miotto, P., Chindelevitch, L., Starks, A. M., Hanna, D., Liwski, R., Zignol, M., Gilpin, C., Niemann, S., Kohl, T. A., Warren, R. M., Crook, D., Gagneux, S., Hoffner, S., Rodrigues, C., Comas, I., Engelthaler, D. M., ... Posey, J. (2018). Integrating standardized whole genome sequence analysis with a global *Mycobacterium tuberculosis* antibiotic resistance knowledgebase. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33731-1>

Feng, C. G., Kaviratne, M., Rothfuchs, A. G., Cheever, A., Hieny, S., Young, H. A., Wynn, T. A., & Sher, A. (2006). NK Cell-Derived IFN- γ Differentially Regulates Innate Resistance and Neutrophil Response in T Cell-Deficient Hosts Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7086–7093. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7086>

Floyd, K., Glaziou, P., Zumla, A., & Raviglione, M. (2018). The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: An overview in year 3 of the End TB era. *The Lancet Respiratory Medicine*, 6(4), 299–314. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30057-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30057-2)

Gao, F., Koenitzer, J. R., Tobolewski, J. M., Jiang, D., Liang, J., Noble, P. W., & Oury, T. D. (2008). Extracellular Superoxide Dismutase Inhibits Inflammation by Preventing Oxidative Fragmentation of Hyaluronan. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6058–6066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709273200>

Garton, N. J., Christensen, H., Minnikin, D. E., Adegbola, R. A., & Barer, M. R. (2002). Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum.

Microbiology, 148(10), 2951–2958. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-2951>

Getahun, H., Matteelli, A., Chaisson, R. E., & Raviglione, M. (2015). Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *New England Journal of Medicine*, 372(22), 2127–2135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1405427>

Ghosh, M. C., Gorantla, V., Makena, P. S., Luellen, C., Sinclair, S. E., Schwingshackl, A., & Waters, C. M. (2013). Insulin-like growth factor-I stimulates differentiation of ATII cells to ATI-like cells through activation of Wnt5a. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(3), 222–229. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00014.2013>

Giovanni Delogu, Cinzia Pusceddu, Alessandra Bua, Giovanni Fadda, Michael J. Brennan, & Stefania Zanetti. (2004). *Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of Mycobacterium tuberculosis is surface exposed and influences bacterial cell structure*. *Molecular Microbiology*.

Gleeson, L. E., Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E. M., Triglia, D., O'Leary, S. M., O'Sullivan, M. P., O'Neill, L. A. J., & Keane, J. (2016). Cutting Edge: *Mycobacterium tuberculosis* Induces Aerobic Glycolysis in Human Alveolar Macrophages That Is Required for Control of Intracellular Bacillary Replication . *The Journal of Immunology*, 196(6), 2444–2449. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501612>

Golubovic, S., Stankovic, I., Ristic, L., Cosic, V., Djordjevic, I., & Radovic, M. (2010). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in patients with pulmonary tuberculosis. *Medicinski pregled*, 63(7–8), 450–453. <https://doi.org/10.2298/MPNS1008450G>

- González-Martin, J. (2014). Microbiología de la tuberculosis. *Seminarios de la Fundacion Espanola de Reumatologia*, 15(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.semreu.2014.01.001>
- Gopal, R., Monin, L., Torres, D., Slight, S., Mehra, S., McKenna, K. C., Fallert Junecko, B. A., Reinhart, T. A., Kolls, J., Báez-Saldaña, R., Cruz-Lagunas, A., Rodríguez-Reyna, T. S., Kumar, N. P., Tessier, P., Roth, J., Selman, M., Becerril-Villanueva, E., Baquera-Heredia, J., Cumming, B., ... Khader, S. A. (2013). S100A8/A9 Proteins Mediate Neutrophilic Inflammation and Lung Pathology during Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(9), 1137–1146. <https://doi.org/10.1164/rccm.201304-0803OC>
- Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. D. C., Garfias, Y., Sada, I., & Lascurain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), 142–153.
- Han, S. H., & Mallampalli, R. K. (2015). The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(5), 765–774. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201411-507FR>
- Harding, C. V., & Boom, W. H. (2010). Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: A role for Toll-like receptors. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 296–307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2321>
- Hauser, H. (2020). Phospholipid Vesicles. *Phospholipids Handbook*, 88(February), 603–637. <https://doi.org/10.1201/9780203743577-17>
- Hoffmann, E., Machelart, A., Song, O. R., & Brodin, P. (2018). Proteomics of *Mycobacterium tuberculosis* infection: Moving towards a better understanding of pathogen-

- driven immunomodulation. *Frontiers in Immunology*, 9(JAN), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00086>
- Hong, S. C., Chen, H., Lee, J., Park, H.-K., Kim, Y. S., Shin, H.-C., Kim, C.-M., Park, T. J., Lee, S. J., Koh, K., Kim, H.-J., Chang, C. L., & Lee, J. (2011). Ultrasensitive immunosensing of tuberculosis CFP-10 based on SPR spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156(1), 271–275.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.04.032>
- Hussell, T., & Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. *Nature Reviews Immunology*, 14(2), 81–93.
<https://doi.org/10.1038/nri3600>
- Ichii, O., Kimura, J., Okamura, T., Horino, T., Nakamura, T., Sasaki, H., Elewa, Y. H. A., & Kon, Y. (2017). IL-36 α Regulates Tubulointerstitial Inflammation in the Mouse Kidney. *Frontiers in Immunology*, 8, 1346.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01346>
- Jasenosky, L. D., Scriba, T. J., Hanekom, W. A., & Goldfeld, A. E. (2015). T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunological Reviews*, 264(1), 74–87. <https://doi.org/10.1111/imr.12274>
- Kawahara, J. Y., Irvine, E. B., & Alter, G. (2019). A Case for Antibodies as Mechanistic Correlates of Immunity in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 10, 996.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00996>
- Kinhikar, A. G., Vargas, D., Li, H., Mahaffey, S. B., Hinds, L., Belisle, J. T., & Laal, S. (2006). Mycobacterium tuberculosis malate synthase is a laminin-binding adhesin. *Molecular Microbiology*, 60(4), 999–1013.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05151.x>

- Kolattukudy, P. E., Fernandes, N. D., Azad, A. K., Fitzmaurice, A. M., & Sirakova, T. D. (1997). Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, *24*(2), 263–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3361705.x>
- Kopf, M., Schneider, C., & Nobs, S. P. (2015). The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nature Immunology*, *16*(1), 36–44. <https://doi.org/10.1038/ni.3052>
- Kremer, L., Maughan, W. N., Wilson, R. A., Dover, L. G., & Besra, G. S. (2002). The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Letters in Applied Microbiology*, *34*(4), 233–237. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01091.x>
- Kuipers, M. T., Vogl, T., Aslami, H., Jongsma, G., Van Den Berg, E., Vlaar, A. P. J., Roelofs, J. J. T. H., Juffermans, N. P., Schultz, M. J., Van Der Poll, T., Roth, J., & Wieland, C. W. (2013). High Levels of S100A8/A9 Proteins Aggravate Ventilator-Induced Lung Injury via TLR4 Signaling. *PLoS ONE*, *8*(7), e68694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068694>
- Kumar, G., Dagur, P. K., Singh, P. K., Shankar, H., Yadav, V. S., Katoch, V. M., Bajaj, B., Gupta, R., Sengupta, U., & Joshi, B. (2010). Serodiagnostic Efficacy of Mycobacterium tuberculosis 30/32-kDa Mycolyl Transferase Complex, ESAT-6, and CFP-10 in Patients with Active Tuberculosis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *58*(1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0055-4>
- Kuo, C.-J., Bell, H., Hsieh, C.-L., Ptak, C. P., & Chang, Y.-F. (2012). Novel Mycobacteria Antigen 85 Complex Binding Motif on Fibronectin. *Journal of*

Biological Chemistry, 287(3), 1892–1902.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.298687>

Lai, R., Jeyanathan, M., Afkhami, S., Zganiacz, A., Hammill, J. A., Yao, Y., Kaushic, C., & Xing, Z. (2018). CD11b + Dendritic Cell–Mediated Anti–Mycobacterium tuberculosis Th1 Activation Is Counterregulated by CD103 + Dendritic Cells via IL-10. *The Journal of Immunology*, ji1701109. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701109>

Laidlaw, B. J., Craft, J. E., & Kaech, S. M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 102–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.10>

Lewinsohn, D. A., Swarbrick, G. M., Park, B., Cansler, M. E., Null, M. D., Toren, K. G., Baseke, J., Zalwango, S., Mayanja-Kizza, H., Malone, L. L., Nyendak, M., Wu, G., Guinn, K., McWeeney, S., Mori, T., Chervenak, K. A., Sherman, D. R., Boom, W. H., & Lewinsohn, D. M. (2017). Comprehensive definition of human immunodominant CD8 antigens in tuberculosis. *Npj Vaccines*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0008-6>

Li, H., & Javid, B. (2018). Antibodies and tuberculosis: Finally coming of age? *Nature Reviews Immunology*, 18(9), 591–596. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0028-0>

Li, H., Wang, X., Wang, B., Fu, L., Liu, G., Lu, Y., Cao, M., Huang, H., & Javid, B. (2017). Latently and uninfected healthcare workers exposed to TB make protective antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19), 5023–5028. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611776114>

- Lin, P. L., Ford, C. B., Coleman, M. T., Myers, A. J., Ioerger, T., Sacchettini, J., Fortune, S. M., & Joanne, L. (2014). *Killing*. *20*(1), 75–79.
<https://doi.org/10.1038/nm.3412.Sterilization>
- Lindestam Arlehamn, C. S., Lewinsohn, D., Sette, A., & Lewinsohn, D. (2014). Antigenes for CD4 and CD8 T Cells in Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(7), a018465–a018465.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018465>
- Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. *Cellular and Molecular Immunology*, *14*(12), 963–975.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>
- Lu, L. L., Chung, A. W., Rosebrock, T. R., Ghebremichael, M., Yu, W. H., Grace, P. S., Schoen, M. K., Tafesse, F., Martin, C., Leung, V., Mahan, A. E., Sips, M., Kumar, M. P., Tedesco, J., Robinson, H., Tkachenko, E., Draghi, M., Freedberg, K. J., Streeck, H., ... Alter, G. (2016). A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell*, *167*(2), 433-443.e14.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.072>
- Lu, L. L., Smith, M. T., Yu, K. K. Q., Luedemann, C., Suscovich, T. J., Grace, P. S., Cain, A., Yu, W. H., McKittrick, T. R., Lauffenburger, D., Cummings, R. D., Mayanja-Kizza, H., Hawn, T. R., Boom, W. H., Stein, C. M., Fortune, S. M., Seshadri, C., & Alter, G. (2019). IFN- γ -independent immune markers of Mycobacterium tuberculosis exposure. *Nature Medicine*, *25*(6), 977–987.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0441-3>
- Mariam, D. H., Mengistu, Y., Hoffner, S. E., & Andersson, D. I. (2004). Effect of rpoB Mutations Conferring Rifampin Resistance on Fitness of Mycobacterium

tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1289–1294.
<https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1289-1294.2004>

Marino, S., Cilfone, N. A., Mattila, J. T., Linderman, J. J., Flynn, J. L., & Kirschner, D. E. (2015). Macrophage polarization drives granuloma outcome during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*, 83(1), 324–338.
<https://doi.org/10.1128/IAI.02494-14>

Martineau, A. R., Newton, S. M., Wilkinson, K. A., Kampmann, B., Hall, B. M., Nawroly, N., Packe, G. E., Davidson, R. N., Griffiths, C. J., & Wilkinson, R. J. (2007). Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1988–1994. <https://doi.org/10.1172/JCI31097>

Martínez Cordero, E., González, M. M., Aguilar, L. D., Orozco, E. H., & Hernández Pando, R. (2008). Alpha-1-acid glycoprotein, its local production and immunopathological participation in experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 88(3), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.10.004>

Maulén, N. P. (2011). [Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*]. *Revista medica de Chile*, 139(12), 1605–1610. <https://doi.org/S0034-98872011001200012>

Mayer-Barber, K. D., Andrade, B. B., Barber, D. L., Hieny, S., Feng, C. G., Caspar, P., Oland, S., Gordon, S., & Sher, A. (2011). Innate and Adaptive Interferons Suppress IL-1 α and IL-1 β Production by Distinct Pulmonary Myeloid Subsets during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Immunity*, 35(6), 1023–1034.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.002>

Mayer-Barber, K. D., & Barber, D. L. (2015). Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Cold Spring Harbor*

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018424>

- Mogues, T., Goodrich, M. E., Ryan, L., LaCourse, R., & North, R. J. (2001). The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*, *193*(3), 271–280. <https://doi.org/10.1084/jem.193.3.271>
- Nguyen, L., Chinnapapagari, S., & Thompson, C. J. (2005). FbpA-Dependent Biosynthesis of Trehalose Dimycolate Is Required for the Intrinsic Multidrug Resistance, Cell Wall Structure, and Colonial Morphology of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, *187*(19), 6603–6611. <https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6603-6611.2005>
- Nicholas, B., Skipp, P., Mould, R., Rennard, S., Davies, D. E., O'Connor, C. D., & Djukanović, R. (2006). Shotgun proteomic analysis of human-induced sputum. *Proteomics*, *6*(15), 4390–4401. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600011>
- Nicholson, S., Bonecini-Almeida, M. D. G., Lapa E Silva, J. R., Nathan, C., Xie, Q. W., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N., Linhares, C., Rom, W., & Ho, J. L. (1996). Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, *183*(5), 2293–2302. <https://doi.org/10.1084/jem.183.5.2293>
- O'Leary, S., O'Sullivan, M. P., & Keane, J. (2011). IL-10 blocks phagosome maturation in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *45*(1), 172–180. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0319OC>

- O'Shea, M. K., Tanner, R., Müller, J., Harris, S. A., Wright, D., Stockdale, L., Stylianou, E., Satti, I., Smith, S. G., Dunbar, J., Fletcher, T. E., Dedicoat, M., Cunningham, A. F., & McShane, H. (2018). Immunological correlates of mycobacterial growth inhibition describe a spectrum of tuberculosis infection. *Scientific Reports*, *8*(1), 14480. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32755-x>
- Portal-Celhay, C., Tufariello, J. M., Srivastava, S., Zahra, A., Klevorn, T., Grace, P. S., Mehra, A., Park, H. S., Ernst, J. D., Jacobs, W. R., & Philips, J. A. (2016). Mycobacterium tuberculosis EsxH inhibits ESCRT-dependent CD4+ T-cell activation. *Nature Microbiology*, *2*(2), 16232. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.232>
- Prados-Rosales, R., Baena, A., Martinez, L. R., Luque-Garcia, J., Kalscheuer, R., Veeraraghavan, U., Camara, C., Nosanchuk, J. D., Besra, G. S., Chen, B., Jimenez, J., Glatman-Freedman, A., Jacobs, W. R., Porcelli, S. A., & Casadevall, A. (2011). Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(4), 1471–1483. <https://doi.org/10.1172/JCI44261>
- Randall, P. J., Hsu, N. J., Quesniaux, V., Ryffel, B., & Jacobs, M. (2015). Mycobacterium tuberculosis infection of the “non-classical immune cell”. *Immunology and Cell Biology*, *93*(9), 789–795. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.43>
- Rigoni, A., Colombo, M. P., & Pucillo, C. (2018). Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. *Seminars in Immunology*, *35*(August 2017), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.001>

- Rivas-Santiago, B., Hernandez-Pando, R., Carranza, C., Juarez, E., Contreras, J. L., Aguilar-Leon, D., Torres, M., & Sada, E. (2008). Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infection and Immunity*, *76*(3), 935–941. <https://doi.org/10.1128/IAI.01218-07>
- Robinson, R. T., Orme, I. M., & Cooper, A. M. (2015). The onset of adaptive immunity in the mouse model of tuberculosis and the factors that compromise its expression. *Immunological Reviews*, *264*(1), 46–59. <https://doi.org/10.1111/imr.12259>
- Roy, M. G., Livraghi-Butrico, A., Fletcher, A. A., McElwee, M. M., Evans, S. E., Boerner, R. M., Alexander, S. N., Bellinghausen, L. K., Song, A. S., Petrova, Y. M., Tuvim, M. J., Adachi, R., Romo, I., Bordt, A. S., Bowden, M. G., Sisson, J. H., Woodruff, P. G., Thornton, D. J., Rousseau, K., ... Evans, C. M. (2014). Muc5b is required for airway defence. *Nature*, *505*(7483), 412–416. <https://doi.org/10.1038/nature12807>
- Sampson, S. L. (2011). Mycobacterial PE/PPE Proteins at the Host-Pathogen Interface. *Clinical and Developmental Immunology*, *2011*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/497203>
- Sande, O. J., Karim, A. F., Li, Q., Ding, X., Harding, C. V., Rojas, R. E., & Boom, W. H. (2016). Mannose-Capped Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* Induces CD4+ T Cell Anergy via GRAIL. *The Journal of Immunology*, *196*(2), 691–702. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500710>

- Sayera Banu, Nadine Honoré, Brigitte Saint Joanis, Dana Philpott, Marie-Christine Prévost, & Stewart T. Cole. (2002). *Are the PE-PGRS proteins of Mycobacterium tuberculosis variable surface antigens?* 44, 9–19.
- Schuck, S. D., Mueller, H., Kunitz, F., Neher, A., Hoffmann, H., Franken, K. L. C. M., Repsilber, D., Ottenhoff, T. H. M., Kaufmann, S. H. E., & Jacobsen, M. (2009). Identification of T-Cell Antigens Specific for Latent Mycobacterium Tuberculosis Infection. *PLoS ONE*, 4(5), e5590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005590>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *En Journal of Cellular Physiology* (Vol. 233, Número 9). <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Shu Hui Cao, CHEN Yan Qing, SUN Yong, LIU Yang, ZHENG Su Hua, ZHANG Zhi Guo, & LI Chuan You. (2018). Screening of Serum Biomarkers for Distinguishing between Latent and Active Tuberculosis Using Proteome Microarray. *Biomed Environ Sci*, 515–526. <https://doi.org/10.3967/bes2018.069>
- Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of mycobacterium tuberculosis infections. *Gram-Positive Pathogens*, 7(4), 1056–1086. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch64>
- Silver, R. F., Walrath, J., Lee, H., Jacobson, B. A., Horton, H., Bowman, M. R., Nocka, K., & Sypek, J. P. (2009). Human alveolar macrophage gene responses to mycobacterium tuberculosis strains H37Ra and H37Rv. *American Journal of*

Respiratory Cell and Molecular Biology, 40(4), 491–504.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0219OC>

Silver, R. F., Zukowski, L., Kotake, S., Li, Q., Pozuelo, F., Krywiak, A., & Larkin, R. (2003). Recruitment of Antigen-Specific Th1-Like Responses to the Human Lung following Bronchoscopic Segmental Challenge with Purified Protein Derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(1), 117–123. <https://doi.org/10.1165/rcmb.4840>

Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 463–496. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.463-496.2003>

Srivastava, S., Grace, P. S., & Ernst, J. D. (2016). Antigen Export Reduces Antigen Presentation and Limits T Cell Control of *M. tuberculosis*. *Cell Host & Microbe*, 19(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.003>

Strålin, P., Karlsson, K., Johansson, B. O., & Marklund, S. L. (1995). The Interstitium of the Human Arterial Wall Contains Very Large Amounts of Extracellular Superoxide Dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(11), 2032–2036. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.11.2032>

Strunk, R. C., Eidlen, D. M., & Mason, R. J. (1988). Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 81(5), 1419–1426. <https://doi.org/10.1172/JCI113472>

Sun, H., Pan, L., Jia, H., Zhang, Z., Gao, M., Huang, M., Wang, J., Sun, Q., Wei, R., Du, B., Xing, A., & Zhang, Z. (2018). Label-Free Quantitative Proteomics Identifies Novel Plasma Biomarkers for Distinguishing Pulmonary Tuberculosis

and Latent Infection. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1267.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01267>

Tallieux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L. P., Gluckman, J. C., Lagrange, P. H., Gicquel, B., & Neyrolles, O. (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 121–127. <https://doi.org/10.1084/jem.20021468>

Tan, B. H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Bloom, B. R., Ganz, T., Modlin, R. L., & Stenger, S. (2006). Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1864–1871. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1864>

Tian, T., Woodworth, J., Sköld, M., & Behar, S. M. (2005). In Vivo Depletion of CD11c + Cells Delays the CD4 + T Cell Response to Mycobacterium tuberculosis and Exacerbates the Outcome of Infection . *The Journal of Immunology*, 175(5), 3268–3272. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3268>

Tran, A. C., Kim, M.-Y., & Reljic, R. (2019). Emerging Themes for the Role of Antibodies in Tuberculosis. *Immune Network*, 19(4), e24. <https://doi.org/10.4110/in.2019.19.e24>

Trutneva, K. A., Shleeva, M. O., Demina, G. R., Vostroknutova, G. N., & Kaprelyans, A. S. (2020). One-Year Old Dormant, “Non-culturable” Mycobacterium tuberculosis Preserves Significantly Diverse Protein Profile. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00026>

- Tsukaguchi, K., Balaji, K. N., & Boom, W. H. (1995). CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *The Journal of Immunology*, *154*(4), 1786–1796. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.154.4.1786>
- Vacca, P., Chiossone, L., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2019). Heterogeneity of NK cells and other innate lymphoid cells in human and murine decidua. *Frontiers in Immunology*, *10*(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00170>
- Van Altena, R., Duggirala, S., I. P.Groschel, M., & S. Van Der Werf, T. (2011). Immunology in Tuberculosis: Challenges in Monitoring of Disease Activity and Identifying Correlates of Protection. *Current Pharmaceutical Design*, *17*(27), 2853–2862. <https://doi.org/10.2174/138161211797470228>
- van Pinxteren, L. A. H., Cassidy, J. P., Smedegaard, B. H. C., Agger, E. M., & Andersen, P. (2000). Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. *European Journal of Immunology*, *30*(12), 3689–3698. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200012\)30:12<3689::aid-immu3689>3.3.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200012)30:12<3689::aid-immu3689>3.3.co;2-w)
- VanderVen, B. C., Huang, L., Rohde, K. H., & Russell, D. G. (2016). The Minimal Unit of Infection: *Mycobacterium tuberculosis* in the Macrophage. *Microbiology Spectrum*, *4*(6), 4.6.32. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0025-2016>
- Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S., & Possmayer, F. (1998). The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1408*(2–3), 90–108. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00061-1)

- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, *174*(5), 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- Wayne, L. G., & Sramek, H. A. (1994). Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*(9), 2054–2058. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2054>
- Weiss, G., & Schaible, U. E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological Reviews*, *264*(1), 182–203. <https://doi.org/10.1111/imr.12266>
- Westphalen, K., Gusarova, G. A., Islam, M. N., Subramanian, M., Cohen, T. S., Prince, A. S., & Bhattacharya, J. (2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*, *506*(7489), 503–506. <https://doi.org/10.1038/nature12902>
- Whitsett, J. A. (2014). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature Immunology*, *16*(1), 339351. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.Respiratory
- Wolf, A. J., Linas, B., Trevejo-Nuñez, G. J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo . *The Journal of Immunology*, *179*(4), 2509–2519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2509>
- Xie, Y., Zhou, Y., Liu, S., & Zhang, X. (2021). PE_PGRS: Vital proteins in promoting mycobacterial survival and modulating host immunity and metabolism. *Cellular Microbiology*, *23*(3). <https://doi.org/10.1111/cmi.13290>

- Yang, J. D., Mott, D., Sutiwisesak, R., Lu, Y.-J., Raso, F., Stowell, B., Babunovic, G. H., Lee, J., Carpenter, S. M., Way, S. S., Fortune, S. M., & Behar, S. M. (2018). Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ and CD8+ T cells differ in their capacity to recognize infected macrophages. *PLOS Pathogens*, *14*(5), e1007060. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007060>
- Zhang, X., Liu, F., Li, Q., Jia, H., Pan, L., Xing, A., Xu, S., & Zhang, Z. (2014). A proteomics approach to the identification of plasma biomarkers for latent tuberculosis infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *79*(4), 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.04.005>

X. ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Le invitamos a participar en el proyecto de investigación “**Detección de proteínas inmunogénicas de *Mycobacterium tuberculosis* con suero de pacientes en el estadio latente de la enfermedad**” cuyo objetivo es **identificar proteínas que desencadenen una respuesta de protección por parte del sistema inmune, contra las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis***. Este es un proyecto de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), Facultad de Ciencias Naturales. Es importante que usted comprenda la importancia del estudio, qué va a implicar su participación, cómo se va a utilizar su información y los resultados del mismo.

XI. Propósito del estudio:

La tuberculosis es una enfermedad causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* la cual infecta principalmente a los tejidos del pulmón, generando neumonías severas. Esta enfermedad puede presentar dos fases importantes, la de latencia o la enfermedad activa. En la fase de latencia, la bacteria queda contenida en una estructura llamada granuloma, la cual previene que la bacteria pueda infectar más tejidos del organismo, teniéndola contenida por años. Sin embargo, se ha demostrado que la bacteria tiene la capacidad de poder seguir replicándose dentro del granuloma hasta tal punto que esta estructura no es capaz de seguir conteniéndola, lo que provoca que haya lesiones secundarias en más tejidos del organismo. La fase de latencia de la enfermedad es de suma importancia porque, tiene la capacidad de convertirse en fase activa debido a diferentes comorbilidades que el paciente pueda presentar, como por ejemplo, diabetes, mala nutrición o coinfecciones con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH).

La selección de los sujetos que pueden participar en el proyecto incluyen: voluntarios sanos mayores de edad, que hayan sido vacunados con la vacuna BCG, no tener tuberculosis activa, que no tengan coinfecciones con VIH o estar inmunosuprimido, y que el paciente tenga sospecha de tener tuberculosis.

El objetivo de este estudio es **identificar proteínas que desencadenen una respuesta de protección por parte del sistema inmune, para combatir las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* en estadio latente**, es decir, que sean capaces de activar la producción de anticuerpos que combatan la infección. Para este estudio se requiere el uso de sueros de voluntarios sanos, expuestos a *Mycobacterium tuberculosis*, que cumplan con los criterios descritos anteriormente.

Debe quedar claro que su participación es voluntaria y no condiciona la atención médica en la institución a la que usted tiene derecho. Si usted decide participar, deberá llenar un formulario, que le tomará entre 10 y 15 minutos y se entregará junto con este documento, en el que se incluirán datos del estado de salud del voluntario. Posteriormente una persona capacitada, realizará la toma de muestra sanguínea, que consiste en la colocación del torniquete en la parte media del brazo, la desinfección del sitio de extracción con alcohol al 70% y la introducción de una aguja en la vena para la recolección de sangre, se llenará un solo tubo de 10 ml, este es un procedimiento ambulatorio, cuyas complicaciones no son mayores a un ligero dolor en el área de donde se extrajo la sangre y la posible formación de un hematoma, en algunos pacientes, por sus características individuales, resulta difícil extraer la muestra de sangre, por lo que tal vez sea preciso puncionarle dos veces para extraer muestra de sangre suficiente.

Los resultados de su muestra se evaluarán en las siguientes 24 horas posteriores, los resultados del análisis serán utilizados únicamente para fines de investigación científica y solo para la identificación de proteínas que desencadenen una respuesta por parte del organismo para combatir la infección por *M. tuberculosis*. En este estudio **no se manejarán datos de identificación personal**, para asegurar la protección del voluntario, en ningún momento el investigador podrá correlacionar los resultados obtenidos de la investigación con la identidad del voluntario, para evitar conflictos éticos con la institución o personal con que conviva el voluntario, por lo que, en caso de detectar anticuerpo contra la bacteria, no se darán a conocer estos resultados a ninguna persona o institución.

Los presentes análisis sentarán las bases para el diseño de nuevas vacunas contra este patógeno que podrían controlar los brotes de la bacteria reduciendo las tasas

de mortalidad y morbilidad además de prevenir la infección en pacientes en riesgo.

La incomodidad en la toma de muestra es el único efecto adverso al que se le somete. Los beneficios de participar en este estudio, consistirán únicamente en recibir orientación sobre las infecciones producidas por *M. tuberculosis* expuesta en este consentimiento informado.

Los presentes análisis asentaran las bases para el diseño de nuevas vacunas contra este patógeno que podrían controlar los brotes de la bacteria reduciendo las tasas de mortalidad y morbilidad además de prevenir la infección en pacientes en riesgo.

La incomodidad en la toma de muestra es el único efecto adverso al que se le somete. Los beneficios de participar en este estudio, consistirán únicamente en recibir orientación sobre las infecciones producidas por *M. tuberculosis* expuesta en este consentimiento informado.

I. Acuerdo de confidencialidad:

Para este estudio no se manejarán datos de identificación personal, exentando la firma y llenado de este consentimiento informado, posterior a la autorización del voluntario a participar, el llenado del cuestionario y la toma de muestra **no requiere datos de identificación personal**, es decir en ningún momento del estudio es requerido su nombre o apellido, asegurando la confidencialidad de sus datos. **Para el manejo de la investigación** se les asignará un número código a su muestra, sin ninguna relación con sus datos de identidad, en ningún momento el investigador podrá correlacionar los resultados obtenidos de la investigación con la identidad del voluntario. Ninguna persona sin autorización podrá conocer sus datos o tener acceso a ellos. Los datos obtenidos como resultado de esta investigación podrían ser utilizados para publicaciones científicas, en las que en ningún momento aparecerá su identidad.

II. Destino de la muestra biológica:

Las muestras derivadas de este estudio se almacenarán en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la UAQ hasta concluir la

investigación antes mencionada, posteriormente serán desechadas de acuerdo a los protocolos para el manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI). El acceso a las muestras solo podrá realizarse bajo la conformidad del investigador que tiene asignada la responsabilidad de custodiarlas bajo las pautas de este documento firmado.

Para cualquier duda referente a su participación, sírvase comunicarse con: Lic. en Microbiología Roxanna Marisol Layseca Gress, investigador promotor del estudio al correo: rlayseca28@alumnos.uaq.mx y la Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez, investigador que dirige el estudio, al correo: bicarvajal@uaq.mx

El protocolo del que deriva este consentimiento informado, así como el propio consentimiento, fue evaluado por el Comité de Bioética de la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro (DIPA-UAQ).

Cualquier duda que considere que no puede ser resuelta por el investigador, puede contactarse a: <http://bioetica.uaq.mx/index.php/contacto>

Declaración:

He leído con cuidado este consentimiento informado, **he hecho todas las preguntas que he deseado y todas me han sido respondidas satisfactoriamente.**

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos del proyecto, criterios de selección de participantes y los posibles inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en que mi muestra sanguínea podrá ser utilizada para fines de investigación y solo para la identificación de proteínas inmunogénicas de *M. tuberculosis*. Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Yo, _____ declaro que es mi decisión participar en el estudio de forma voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio, sin que sufra pérdida de beneficios en las instituciones de salud.

Lugar y fecha: _____

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del investigador que recibe

